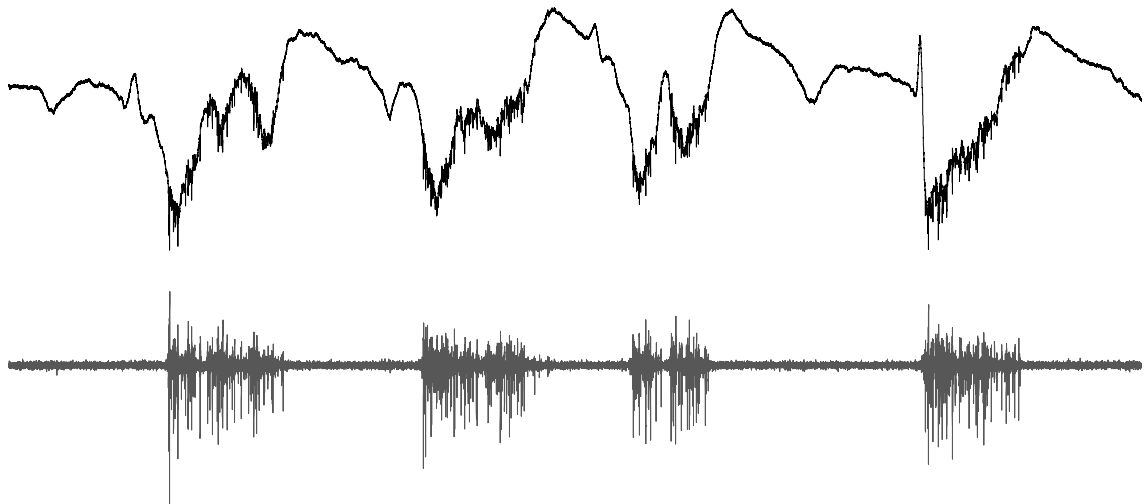




Universidad Pablo de Olavide, Sevilla
Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología
Celular

TESIS DOCTORAL

**Estudios de los Cambios Tempranos en la
Actividad de la Corteza Somatosensorial
Primaria tras una Lesión Medular en Ratas
Anestesiadas**



**Desiré Humanes Valera
Sevilla, 2013**

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	1
1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	5
2.1. Lesión medular.....	5
2.2. Sistema somatosensorial.....	8
2.2.1. Vía de lemnisco medial o vía de las columnas dorsales.....	10
2.2.2. Sistema anterolateral.....	15
2.3. Estructuras del sistema somatosensorial.....	18
2.3.1. Médula espinal.....	18
2.3.2. Tronco del encéfalo.....	24
2.3.3. Tálamo somatosensorial.....	26
2.3.4. Corteza somatosensorial.....	29
2.3.4.1. Generalidades.....	29
2.3.4.2. Corteza somatosensorial primaria (SI).....	30
2.3.4.3. Clases de neuronas corticales.....	33
2.3.4.4. Actividad cortical espontánea.....	35
2.3.4.5. Actividad cortical evocada.....	38
2.4. Daño y patología del sistema somatosensorial.....	39
3. Objetivos.....	43
4. Materiales y Métodos.....	45
4.1. Protocolo experimental.....	46
4.2. Registros electrofisiológicos.....	49
4.2.1. Registros extracelulares.....	49
4.2.2. Registros intracelulares.....	52
4.3. Estimulación periférica.....	53
4.4. Experimentos control.....	55
4.4.1. Experimento de bloqueos farmacológicos.....	55
4.4.2. Experimento control durante anestesia ligera.....	57
4.4.3. Experimento control durante anestesia profunda.....	57
4.5. Análisis de datos.....	58
4.5.1. Respuestas corticales.....	58
4.5.2. Actividad espontánea.....	61
4.5.3. Correlación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas.....	64
4.6. Análisis estadístico.....	65
4.6.1. Análisis estadísticos del primer objetivo.....	65
4.6.2 Análisis estadísticos del segundo objetivo.....	65

5. Resultados.....	68
5.1. Cambios corticales dependiente del estado.....	70
5.1.1. Cambios en las respuestas corticales.....	70
5.1.2. Cambios de la actividad cortical espontánea.....	73
5.1.3. Relación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas.....	75
5.1.4. Cambios en la corteza desaferentada.....	77
5.1.5. Bloqueo farmacológico de la médula espinal.....	80
5.1.6. Experimento control durante anestesia ligera.....	84
5.1.7. Requerimientos de anestesia en animales lesionados.....	85
5.2. Cambios corticales independientes del estado.....	89
5.2.1. Actividad espontánea.....	90
5.2.2. Caracterización de las respuestas evocadas en la corteza somatosensorial intacta: dependencia e independencia del estado.....	94
5.2.3. Relación entre la actividad espontánea cortical y las respuestas evocadas en cada estímulo de forma individual.....	99
5.2.4. Experimentos adicionales: consistencia espacial, especificidad espacial y controles.....	103
5.2.5. Respuestas evocadas en la corteza desaferentada de la garra trasera al estímulo de la garra trasera.....	107
6. Discusión.....	113
6.1. Cambios del estado cortical y de las respuestas evocadas en la corteza somatosensorial primaria.....	114
6.1.1. Cambios en las respuestas corticales.....	114
6.1.2. Cambios en la actividad cortical espontánea.....	117
6.1.3. Relación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas.....	118
6.1.4. Bloqueo farmacológico de la médula: una desaferentación sensorial reversible.....	120
6.1.5. Descenso en los requerimientos de anestesia en animales con lesión aguda: implicaciones clínicas.....	121
6.2. Cambios en las respuestas corticales después de una lesión medular: mecanismos dependientes e independientes del estado	124
6.2.1. Reorganización fisiológica de la corteza cerebral intacta (garra delantera) después de una lesión medular torácica.....	125
6.2.2. Reorganización fisiológica de la corteza cerebral desaferentada (garra trasera) después de una lesión medular torácica.....	128

6.2.3. Posibles mecanismos de la reorganización cortical independiente del estado.....	130
6.2.4. Significancia fisiopatológica.....	134
7. Conclusiones.....	136
8. Referencias.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT= Serotonina

ACh= Acetilcolina

ANOVA= Análisis de varianza

DA= Dopamina

DOWN o DOWN state = Estado silente

EEG= Electroencefalografía

fMRI= Técnica de imagen de resonancia magnética funcional

FP= Garra delantera

FRB= Célula fast-rhythmic-bursting

FS= Célula fast-spiking

GAD= Ácido glutámico descarboxilasa

HP= Garra trasera

IB= Célula intrinsically-bursting

LFP= Potencial de campo local

LP= Núcleo talámico lateral posterior

MUA= Actividad multi-unitaria

NE= Norepinefrina

NRT= Núcleo reticular talámico

Po= Núcleo talámico posterior

Pom= Núcleo talámico posterior medial.

PSTH= Histograma peri-estímulos

rMUA= Actividad multi-unitaria rectificada

RS= Célula regular-spiking

S= Pendiente

SEP= Potenciales evocados somatosensoriales

SI= Corteza somatosensorial primaria

TTX= Tetrodotoxina

UP o UP state= Estado activado

VGAT= Transportador vesicular de GABA

VGlut= Transportador vesicular de Glutamato

VI= Corteza visual primaria

VPL= Núcleo talámico ventral posterior lateral

VPM= Núcleo talámico ventral posterior medial

VSD= Técnica de imagen de fluorescencia sensible a voltaje

WHI = Vibrisas

1. RESUMEN

La lesión medular es un daño del sistema nervioso central cuyo efecto más evidente es la falta de movilidad voluntaria por debajo del nivel de la lesión. Sin embargo, también existen problemas asociados al daño del sistema somatosensorial, que a largo plazo derivan en patologías como el dolor neuropático y el miembro fantasma. Estas patologías se han relacionado con una reorganización en diferentes niveles del sistema que se ha estudiado principalmente en la corteza somatosensorial.

El objetivo general de esta tesis ha sido el estudio de los cambios en la actividad cortical que suceden de forma inmediata después de lesión medular, para conseguir un mejor conocimiento de las primeras etapas del desarrollo de las patologías observadas a largo plazo en pacientes. Realizamos un estudio en ratas anestesiadas de la actividad de la corteza somatosensorial primaria antes y después de una lesión torácica completa de la médula espinal (T9-10). Esta lesión medular ha permitido estudiar simultáneamente la actividad de la representación cortical de la garra delantera, que permanece intacta, junto con la actividad de la representación cortical de la garra trasera, que queda desaferentada por la lesión. En un primer lugar, después de la lesión obtuvimos un incremento inesperado en las respuestas evocadas de la corteza de la garra delantera tras la estimulación de la garra delantera. En segundo lugar, observamos que inmediatamente después de la lesión medular existe un cambio de estado en la actividad cortical, que ralentiza desde un estado delta (1-4Hz) hacia un estado de onda lenta (<1Hz). El cambio en el estado de la actividad espontánea explica, por lo menos en parte, el incremento de las respuestas en la corteza intacta.

El hecho de que exista una disminución de la actividad cortical después de lesión medular se puede asemejar a un estado de anestesia más profunda, lo que nos llevó a plantearnos que podría existir una disminución de los

requerimientos de anestesia en animales lesionados comparado con los animales intactos. La comparación de las cantidades totales de anestesia aplicadas a los animales intactos respecto a los animales lesionados mostró que hay una disminución de los requerimientos de anestesia en los animales lesionados, lo que sugiere que se debería tener en cuenta a nivel clínico en pacientes.

El resultado principal de los experimentos realizados fue que existe un cambio de estado en la corteza somatosensorial hacia una actividad cortical en onda lenta, que favorece el incremento de las respuestas evocadas. Pero hay estudios que sugieren la existencia de mecanismos de desenmascaramiento de sinapsis después de diferentes lesiones del sistema nervioso que generan un aumento de respuestas evocadas. Estos estudios indican que el incremento de respuestas observado en nuestros experimentos también podría deberse a otros mecanismos independientes del estado de la actividad cortical. Se realizaron experimentos donde se controló el estado cortical mediante dosis de anestesia, confirmando que no hubo cambio de estado antes y después de lesión. Los resultados mostraron que parte de los cambios corticales observados en las respuestas evocadas son independientes del estado.

En su conjunto, este trabajo demuestra que una lesión medular produce cambios fisiológicos a nivel cortical de forma inmediata. Estos cambios inmediatos pueden ayudar a entender los mecanismos tempranos que subyacen a una reorganización cortical a largo plazo en pacientes. Este estudio es un primer paso para poder entender y así desarrollar intervenciones para subsanar patologías u optimizar la recuperación después de sufrir la lesión.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Lesión medular

Una lesión medular es un daño del sistema nervioso central. Este daño puede producir pérdida, en un mayor o menor grado, de la percepción sensorial y la movilidad voluntaria, además del mal funcionamiento de diferentes órganos internos. La lesión medular puede suceder por diferentes causas, como lesiones en relación al desarrollo, lesiones inflamatorias, daño con origen tumoral, fallos de carácter vascular y por traumas.

Existe una escala utilizada en la evaluación clínica de la lesión medular dada por la “American Spinal Injury Association” (ASIA), que evalúa las funciones sensitivas y motoras que se preservan posteriores a la lesión (Ditunno et al., 1994; Maynard et al., 1997; Kirshblum et al., 2002). Los efectos sobre las estructuras nerviosas de una lesión a nivel de la médula espinal varían de acuerdo con el tipo de lesión y el nivel donde se produce dicha lesión. En base a estos dos criterios se puede realizar una clasificación básica de lesiones.

En primer lugar, las lesiones se pueden clasificar según el tipo de lesión:

- Una lesión medular completa es aquella que produce un corte de todas las conexiones neuronales entre regiones medulares por debajo y por encima del nivel de lesión. La lesión define una frontera anatómica y sobre todo fisiológica de las señales sensoriales que se originan en un nivel por debajo del daño, y para las señales motoras con origen encefálico que deberían alcanzar niveles inferiores a la lesión. El paciente que sufre este tipo de lesión no tiene sensibilidad alguna y no puede generar ningún tipo de movimiento voluntario por debajo del nivel de la lesión. Las lesiones completas por tanto son bilaterales, afectando de la misma forma a ambos lados del cuerpo que se encuentran por debajo del nivel de lesión.

- Una lesión medular incompleta es aquella en la que se produce un corte parcial de conexiones neuronales ascendentes y descendentes, por tanto

existen vías que quedarán preservadas en distinto grado. En estos casos existe una gran variabilidad de posibilidades, ya que todo dependerá de cuantas vías se ven afectadas y si lo están completamente o parcialmente. El paciente que sufre este tipo de lesión puede tener diferentes grados de sensibilidad y al mismo tiempo un rango de movilidad por debajo del nivel de dicha lesión. Un ejemplo de la complejidad de este tipo de lesión se observa en pacientes que pueden sentir zonas del cuerpo que no pueden mover, o en los que se afecte de manera diferente un lado del cuerpo respecto al otro.

En segundo lugar, las lesiones también se pueden clasificar según su localización anatómica:

- Las lesiones cervicales se localizan en las vértebras cervicales y generalmente tienen como resultado una tetraplejía total o parcial. Ello se debe a la cercanía de la lesión al encéfalo, afectando a una mayor región corporal bajo el nivel de lesión, tanto a nivel sensorial como motor. Dependiendo de la localización exacta de la lesión, las personas con una lesión cervical pueden ser capaces de realizar algunas funciones pero normalmente significa que permanecerán completamente paralizadas.

- Las lesiones torácicas se localizan en la región de vértebras que se encuentran entre las cervicales y las lumbares. Las lesiones a nivel torácico e inferior tienen como resultado la paraplejía, es decir, las regiones corporales de las manos, los brazos, la cabeza, y funciones como la respiración no se suelen ver afectadas. La lesión torácica completa preserva funciones que se regulan por encima del nivel de lesión, y si es incompleta se pueden también preservar parcialmente funciones por debajo del nivel de lesión.

- Las lesiones en la zona lumbar y sacra se localizan en la región de las vértebras por debajo de las torácicas, en niveles inferiores de la médula espinal afectando funciones sensoriales y motoras de tronco inferior. Los efectos de una lesión en la región lumbar o sacra de la médula espinal son la disminución del control de las piernas y de la cadera, así como la afectación de órganos

internos que controlan el sistema urinario y tracto intestinal, control voluntario del ano, etc.

La complejidad de la lesión incrementa cuando se combinan factores como la localización anatómica y el grado de lesión (completa o incompleta). Así que cada lesión medular es realmente única, difícilmente reproducible de paciente a paciente. Por ejemplo, una lesión que suceda a nivel lumbar tendrá unas alteraciones motoras en un paciente concreto con grado de afectación sensorial y motriz, mientras que otra persona con una lesión al mismo nivel medular tendrá diferente grado de afectación. Sin embargo, pueden también aparecer algunas generalidades dependiendo el tipo de lesión y el nivel anatómico.

Como se ha mencionado, la lesión medular afecta al sistema somatosensorial produciendo diferentes patologías en pacientes (dependiendo del tipo y complejidad de la lesión) como el miembro fantasma y el dolor neuropático. Ambos fenómenos están relacionados con una reorganización a largo plazo de la corteza somatosensorial. La preservación parcial de vías ascendentes puede desencadenar también fenómenos de hiperexcitabilidad, a nivel espinal o por debajo del nivel de lesión, generando a su vez dolor en el paciente (Wrigley et al., 2009; Wasner et al., 2008). Otras lesiones que producen patologías similares en relación al dolor y percepción de miembro fantasma son las lesiones que afectan al sistema nervioso periférico, como las amputaciones, o bien lesiones cerebrales generadas por ictus en diferentes regiones del encéfalo (Campbell y Meyer, 2006; Hirouchi et al., 2007; Halder et al., 2013). Las lesiones periféricas también pueden dar lugar a una reorganización cortical a largo plazo (Kaas et al., 1983; Merzenich et al., 1983a, b y 1984; Florence y Kaas, 1995) e incluso en este caso también producen un cambio en diferentes estructuras del sistema somatosensorial a corto plazo o de forma inmediata (Calford y Tweedale, 1991a y b; Faggin et al., 1997; Iwata et al., 2011).

Hoy en día, estas patologías no tienen tratamiento alguno, lo único que se puede hacer es valorar el grado del daño y diseñar un buen plan de cuidados y rehabilitación para mejorar la función de los tractos preservados, por parte de los profesionales de rehabilitación, fisioterapia y enfermería.

Generalmente se piensa que el principal problema de estos pacientes y lo más evidente es la parálisis, la ausencia de movimientos por debajo del nivel de lesión. Sin embargo, la presencia de dolor que se desarrolla a largo plazo es un problema generado también por la lesión que realmente disminuye la calidad de vida. El dolor neuropático o la aparición del miembro fantasma están relacionados con el daño del sistema somatosensorial, es decir, con la ruptura total o parcial de las vías ascendentes que llevan información sobre diferentes modalidades sensoriales. El sistema somatosensorial dañado por una lesión medular también afectará al movimiento, ya que en lesiones incompletas se puede afectar la integración sensorio-motora, o desencadenar espasticidad.

Con este trabajo, nos centramos en los cambios del sistema somatosensorial después de lesión medular y para ello procedemos a describir el sistema.

2.2. Sistema somatosensorial

El sistema somatosensorial se encarga de detectar estímulos del medio externo e interno para transmitirlos a las estructuras del sistema nervioso central donde se producirá una respuesta adecuada en el caso que sea necesario. El sistema somatosensorial detecta 4 modalidades sensoriales diferentes: tacto, propiocepción, temperatura y dolor. Cada modalidad tiene sus propios receptores y estructuras de relevo en el sistema nervioso central, aunque existe convergencia e integración para diferentes modalidades en distintas estructuras a lo largo del sistema.

Las señales se inician en los receptores sensoriales que se encuentran distribuidos por todo el cuerpo, los cuales se encargan de transducir a señales eléctricas los diferentes estímulos detectados. Las señales procedentes de las diferentes regiones corporales viajan por los axones de las neuronas localizadas en los ganglios de las raíces dorsales hasta entrar en el sistema nervioso central. Estas neuronas de los ganglios de las raíces dorsales son denominadas neuronas de primer orden. Los axones de las neuronas de primer orden pueden seguir dos tipos de caminos al entrar en la médula espinal:

- pueden hacer sinapsis en las neuronas de las astas dorsales;
- pueden viajar por la médula a nivel medial y dorsal alcanzando la región más caudal y dorsal del bulbo raquídeo, haciendo sinapsis con neuronas de los núcleos de las columnas dorsales.

Las neuronas que reciben las sinapsis de los axones de las neuronas de primer orden son denominadas neuronas de segundo orden, que se pueden encontrar en las astas dorsales o en los núcleos de las columnas dorsales. De una forma muy general, los axones de las neuronas de segundo orden alcanzan el tálamo somatosensorial, donde se encuentran las neuronas de tercer orden. Finalmente, las neuronas de tercer orden o tálamo-corticales, envían el axón a la corteza cerebral, desde donde la información sigue rutas más complejas.

Los receptores que detectan los diferentes estímulos periféricos se encuentran distribuidos por todo el cuerpo, lo que significa que el sistema es capaz de identificar, de forma precisa, donde está localizado el estímulo en cada momento. Los receptores que activan a una sola fibra aferente conforman lo que se denomina el campo receptor de dicha fibra. El campo receptor definido de una manera general es la región corporal en la cual la presencia de un estímulo activa a una neurona del sistema. Las características del campo receptor dependen tanto de la zona corporal que ocupa como del nivel en el sistema en el que se encuentra la neurona, ya que en diferentes niveles suceden procesos complejos - como convergencia, divergencia y neuromodulación - que

afectan a la estructura de los campos receptores. El ordenamiento del conjunto de campos receptores conforma la representación corporal ordenada espacialmente en cada uno de los niveles del sistema. A este ordenamiento espacial en cada estructura se le denomina somatotopía. La somatotopía confiere al sistema un alto grado de organización espacial, de tal manera que cada región corporal se encuentra representada en cada uno de núcleos de relevo somatosensoriales.

Cada modalidad alcanzará la corteza a través de dos vías principales del sistema somatosensorial: la vía de las columnas dorsales, y el sistema anterolateral.

2.2.1. Vía del lemnisco medial o vía de las columnas dorsales

La vía del lemnisco medial o vía de las columnas dorsales se encarga de detectar y transmitir las modalidades de tacto y propiocepción desde toda la superficie corporal y los receptores musculares y tendinosos hacia el cerebro, alcanzando finalmente la corteza cerebral.

El primer nivel en la vía son las neuronas de primer orden, también llamadas neuronas aferentes primarias, que tienen un calibre grueso y están muy mielinizadas. Son las fibras llamadas $A\alpha$ y $A\beta$, que se caracterizan por tener una alta velocidad de conducción (Rango de $A\alpha$: 70-170m/s y el rango de $A\beta$: 30-70m/s) (Fig. 1).

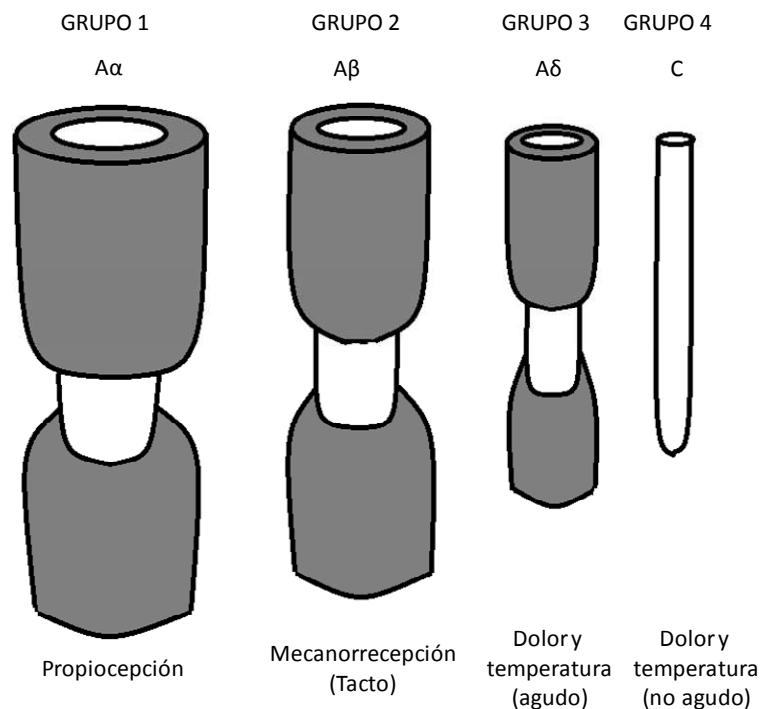


Figura 1: Esquema de los diferentes tipos de axones que caracterizan a las diferentes aferentes primarias, la clasificación es según el grosor del diámetro y la mielina que le rodea.

Las señales periféricas se detectan por diferentes órganos sensoriales que transducen la señal para activar las fibras primarias. Estos órganos son los siguientes: corpúsculo de Meissner, de Pacini, de Ruffini, receptores de Merkel y folículos pilosos para determinar tacto, órgano tendinoso de Golgi y husos musculares para identificar propiocepción en músculos y articulaciones.

Las neuronas de primer orden tienen el axón dispuesto con 2 terminaciones axonales: por un lado, se encuentra una terminación periférica que inerva a su campo receptor y por otro lado, se encuentra la rama axonal que entra en la médula espinal ascendiendo hasta llegar a los núcleos de las columnas dorsales. Las aferentes primarias se ramifican y envían colaterales axónicas en el mismo nivel de entrada hacia el asta dorsal de la médula, contactando con neuronas situadas entre la lámina III y VI. Los axones de estas neuronas decusan a nivel medular y proyectan hacia el fascículo anterolateral.

Las aferencias primarias que ascienden por la médula hacia el tronco del encéfalo lo hacen organizadas espacialmente, de forma que tienen una localización más medial las aferencias con campos receptores más caudales y una localización más lateral las aferencias con campos receptores más rostrales. Este es el inicio de la organización somatotópica que se mantiene y aparece en cada una de las estructuras del sistema. Las fibras que llevan la información procedente de las regiones corporales inferiores entran en médula a nivel de las vertebrae sacras, lumbares y torácicas inferiores (T7-T12) formando la columna dorsal denominada fascículo gracilis, situada junto a la línea media; mientras que las fibras que llevan la información de las regiones corporales superiores entran en la médula a nivel de vertebrae cervicales y torácicas superiores (T1-T6) formando la columna dorsal denominada fascículo cuneatus, que se sitúa de forma lateral a la columna anterior. Las fibras que llevan la información procedente de la cara presentan su soma en el ganglio trigeminal y alcanza el tronco del encéfalo a través del nervio trigémino.

Los núcleos de las columnas dorsales están localizados en la región más caudal del bulbo raquídeo (Paxino, 2004 "The rat nervous system", 3ed.; Delgado et al., 1998 "Manual de neurociencia"). Cada columna dorsal alcanza el núcleo que tiene el mismo nombre, núcleo gracilis y cuneatus, que conservan la disposición medial para el núcleo gracilis por recibir desde regiones más caudales, y más lateral para el núcleo cuneatus que recibe de regiones más rostrales. El ordenamiento espacial de los núcleos de las columnas dorsales responde a la somatotopía que tienen todos los núcleos de relevo de la vía: el núcleo gracilis recibe las fibras aferentes primarias que entran en la médula por debajo de la vertebra torácica 7 (la mitad del tronco inferior y las extremidades inferiores) (Fig. 2; Nord, 1967; Maslany et al.,1991); el núcleo cuneatus es el destino de las fibras que entran en la médula a niveles superiores de la vertebra torácica 6 (la mitad superior del tronco del animal y sus extremidades delanteras) (Fig. 2 y 3; Nord, 1967; Maslany et al.,1991). Finalmente las fibras

procedentes de la región más rostral del cuerpo alcanzan el núcleo principal del complejo trigeminal situado de forma lateral y anterior al núcleo cuneatus (Nord, 1967).

Esto significa que la primera estación de relevo para una parte de la sensibilidad cutánea (tacto y propiocepción) son los núcleos de las columnas dorsales.

En los núcleos de las columnas dorsales se realiza un procesamiento interno de la información ascendente, ya que además de neuronas de proyección tienen interneuronas de circuito local que contribuyen a la selección de señales. Y al mismo tiempo, reciben aferencias de varios núcleos del tronco del encéfalo como el núcleo de rojo, núcleo vestibular y los núcleos cocleares (Weinberg y Rustioni, 1989). Además reciben regulación cortical (Antal, 1984; Chimelli et al., 1994; Desbois et al., 1999; Martinez-Lorezana et al., 2001; Canedo y Aguilar, 2000).

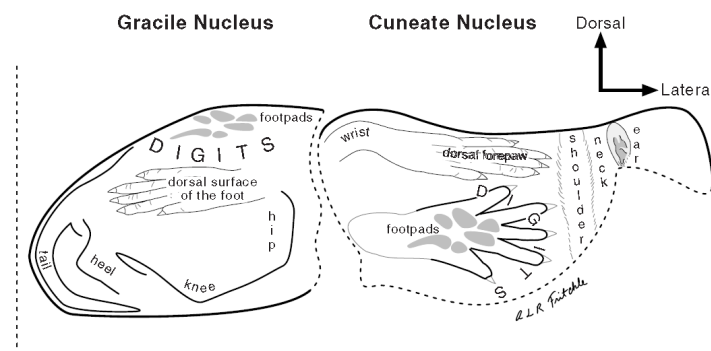


Figura 2. Somatotopía de los núcleos de las columnas dorsales (gracilis y cuneatus). Imagen sacado del Libro "the rat nervous system" 3ºe d.

La neurona de segundo orden parte de los núcleos de las columnas dorsales, su axón decusa en el tronco del encéfalo formando un haz de fibras llamado lemnisco medial que asciende hasta el tálamo somatosensorial.

Las señales que viajan por el lemnisco medial alcanzan el complejo ventrobasal del tálamo, que es la siguiente estructura de relevo en esta vía. El complejo ventrobasal se divide en núcleo ventral posterior lateral (VPL) que recibe señales procedentes del tronco y extremidades del animal (Emmers, 1988), y núcleo ventral posterior medial (VPM) que recibe señales desde parte de la cabeza y el rostro (Waite, 1973). De esta manera, el complejo ventrobasal tiene una organización somatotópica como todas las estructuras de la vía (Fig.3). Dentro del complejo ventrobasal existen neuronas de proyección hacia la corteza somatosensorial (neuronas de tercer orden) e interneuronas de circuito local que tienen la función de procesar y filtrar señales ascendentes. El complejo ventrobasal está regulado principalmente por el núcleo reticular talámico (NRT) con función inhibitoria (Pinault y Deschenes, 1998a, b) y por la corteza somatosensorial (Deschenes et al., 1998; Veinante et al., 2000), además de encontrarse regulado por los sistemas generales de neuromodulación (ACh, NE, 5-HT, DA etc.) (Peschanski y Besson, 1984a, b; Carstens et al., 1990). Las neuronas tálamo-corticales envían los axones a través de la radiación talámica hacia la corteza somatosensorial primaria haciendo sinapsis principalmente en la capa IV cortical.

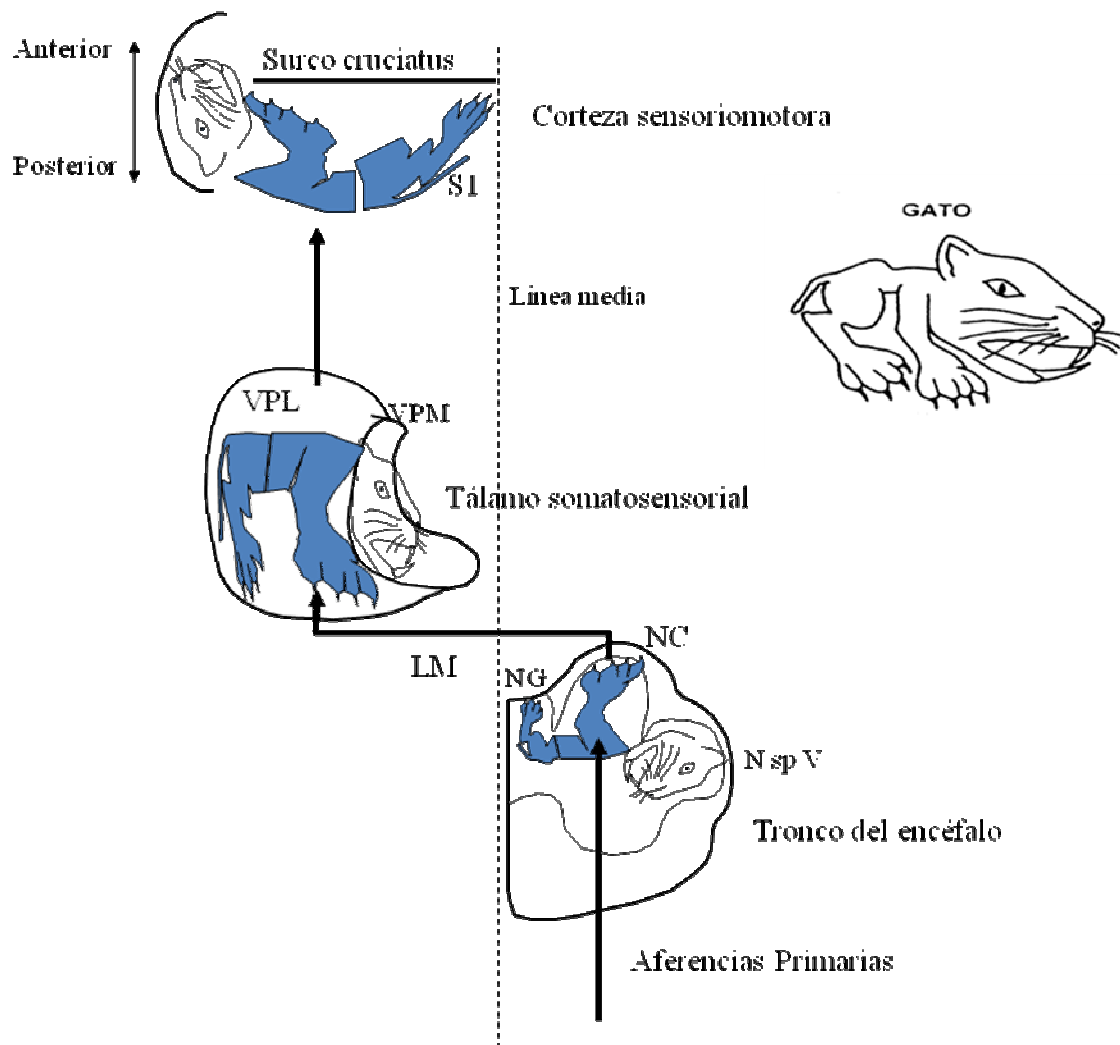


Figura 3. Somatotopía de los distintos núcleos de relevos de la vía lemniscal. Esquema de la somatotopía existente en las estructuras que forman la vía lemniscal basada en el estudio de gatos. Figura extraída de la tesis doctoral de Juan Aguilar con su permiso.

2.2.2. Sistema anterolateral

El sistema anterolateral está formado por varias vías ascendentes sensoriales encargadas de detectar y transmitir las modalidades de temperatura y dolor desde el tronco y las extremidades. El primer nivel de las vías es común y lo forman las neuronas de primer orden cuyo soma se dispone en los ganglios de las raíces dorsales. Las neuronas que detectan estas modalidades tienen fibras de tipo Aδ y C (Fig. 1), las cuales presentan una terminal axónica periférica

libre, es decir, no se encuentran unidas a ningún receptor o célula especializada. Las fibras A δ presentan un menor diámetro y menor grado de mielinización que las fibras A α y A β , con un rango de velocidad de conducción entre 5 y 30m/s. Las modalidades que detectan estas fibras son temperatura y dolor de forma aguda y rápida. Las fibras C son amielínicas y el diámetro es muy fino, su velocidad de conducción es muy lenta (0.5-2m/s) y detectan las modalidades de temperatura y dolor no agudo que se transmite de forma lenta.

Las neuronas de primer orden presentan una ramificación central que entra en la médula a nivel del asta dorsal, y hacen sinapsis en las láminas superficiales (Lámina I y II) aunque también entra a nivel de la Lámina V.

Dentro del sistema anterolateral existen varias vías somatosensoriales que llevan las señales nociceptivas hasta el encéfalo a través de diferentes neuronas de segunda orden, estas vías son: el tracto espinotalámico, el tracto espinoreticular y el tracto espinomesencefálico.

El tracto espinotalámico, es la vía más importante que transmite la sensación de dolor en humanos (Gybels y Sweet, 1989), así como en otras especies, por ejemplo en ratas (Peschanski et al., 1986; Palecek et al., 2002). Lo forman los axones de las neuronas específicas de la nocicepción de las Láminas I y V-VII del asta dorsal, donde se localiza su soma. Estos axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden hasta alcanzar el tálamo, dejando algunas fibras colaterales en la formación reticular del tronco del encéfalo (Kevetter y Willis, 1982, 1983) y sustancia gris periacueductal (Harmann et al., 1988; Liu, 1986). Las neuronas que lo conforman, son por tanto las neuronas de segundo orden en la vía ascendente. Los axones espinotalámicos alcanzan tanto el tálamo lateral como el tálamo medial. Dentro de las dianas del tracto en el tálamo lateral se incluyen el núcleo ventral posterolateral (VPL) y núcleo talámico posterior (Po), mientras que entre las dianas dentro del tálamo medial se encuentran el núcleo central lateral y el

núcleo submedial (Cliffer et al., 1991; Craig y Burton, 1981; Lund y Webster, 1967; Peschanski et al., 1983; Zemlan et al., 1978).

El tracto espinorreticular está formado por las neuronas que hacen sinapsis en la lámina V, VII, VIII y X del asta dorsal de la médula (Chaouch et al., 1983; Kevetter y Willis, 1982, 1983; Nahin y Micevych, 1986; Nahin et al., 1986; Peschanski y Besson, 1984c). Son neuronas de segundo orden cuyos axones cruzan la línea media y ascienden hasta llegar a la formación reticular del tronco del encéfalo, desde donde a su vez se alcanzan los núcleos del tálamo intralaminar a través de colaterales (Kevetter y Willis, 1983).

El tracto espinomesencefálico está formado por las neuronas que hacen sinapsis en la lámina I, V y X del asta dorsal de la médula espinal (Cechetto et al., 1985; Harmann et al., 1988; Lima y Coimbra, 1989; Liu, 1983; Menétrey et al., 1982; Pechura y Liu, 1986; Swett et al., 1985; Yezierski y Mendez, 1991). Los axones de las neuronas ascienden hasta la formación reticular del mesencéfalo y la sustancia gris periacueductal, y por la vía del haz espinoparabraquial se proyecta a los núcleos parabraquiales que es parte del sistema de neuromodulador ascendente, a su vez las neuronas de estos núcleos se proyectan al núcleo amigdalino, componente principal del sistema límbico (Bernard et al., 1989). También se alcanzan otras estructuras mesencefálicas como núcleo intercolicular, las láminas profundas del colículo superior, núcleo pretectal anterior y posterior, y el núcleo rojo.

El tracto espinotalámico, que como hemos mencionado es el tracto más importante de transmisión de las señales nociceptivas, alcanza el tálamo donde se encuentra la neurona de tercer orden que se denomina neurona de proyección talamocortical, cuyo destino es la corteza somatosensorial primaria.

El sistema anterolateral recibe un control descendente desde estructuras del tronco del encéfalo, que al mismo tiempo pueden ser activadas por el tracto espinomesencefálico y espinorreticular a través de las siguientes estructuras: el núcleo parabraquial lateral, sustancia Nigra, el núcleo del Raphe, locus

coeruleus, núcleo pretectal posterior y la sustancia gris periacueductal ventrolateral (Bajic y Proudfit, 1999; Guilbaud et al., 1977; Lee y Beitz, 1993). Además, existe una modulación procedente de corteza somatosensorial, una vez que se percibe la información sensorial de temperatura y dolor, ya que regula o modula la respuesta de salida que se produce una vez integrada toda la información.

La información de temperatura y dolor procedente de la cara o rostro tiene el soma de la neurona de primer orden en el ganglio trigeminal y de ahí se proyecta al núcleo espinal del complejo trigeminal en el tronco del encéfalo. A partir de ese nivel de relevo se forman los diferentes tractos homólogos a los descritos anteriormente: tracto trigémino-talámico, trigémino-reticular y trigémino-mesencefálico.

Finalmente desde el tálamo somatosensorial, la información proveniente de ambas vías (espinotalámico y lemniscal) alcanza la corteza cerebral, en concreto el área somatosensorial primaria. En esta área se produce un procesamiento local, y la información es distribuida a otras regiones corticales y subcorticales que están implicadas en cada vía.

Una vez descritas las vías de una forma general procedemos a detallar cada una de las estructuras que forman parte del sistema somatosensorial contribuyendo al procesamiento de información.

2.3. Estructuras del sistema somatosensorial

2.3.1. Médula espinal

La médula espinal es la parte del sistema nervioso central que conecta el cerebro con los órganos y el resto del cuerpo. La médula tiene funciones sensoriales y motoras, y de coordinación de las diferentes regiones medulares. Tanto por su longitud como por las diferentes regiones corporales con las que se corresponde, la médula tiene gran complejidad en composición neuronal y

tractos de fibras ascendentes y descendentes. Sin embargo, se pueden encontrar algunas generalidades en estructura y función a lo largo de todas las localizaciones medulares.

En un corte transversal de la médula espinal se puede observar que existen diferentes regiones que de forma general se corresponden con la localización de grupos neuronales y tractos de fibra, los cuales se encargan de realizar las diferentes funciones medulares. En la región central se localiza la sustancia gris, con forma de alas de mariposa o H, que es donde se disponen los somas de las neuronas. Rodeando la región central aparece la sustancia blanca, formada por tractos de fibras o axones de las neuronas que ascienden o descienden a lo largo de la médula espinal.

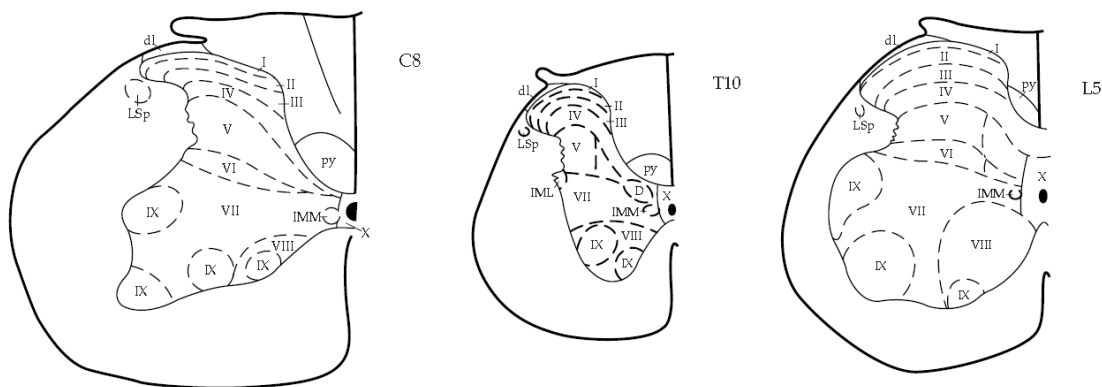


Figura 4. Organización de la médula espinal. Esquemas de tres cortes anatómicos en diferentes niveles medulares de rata. Paxino, 2004 "the rat nervous system". La estructura anatómica de la médula espinal se va modificando según en la zona corporal que inerva como se puede observar en los esquemas. C8, vértebra cervical 8; T10, vértebra torácica 10 y; L5, vértebra lumbar.

La sustancia gris se puede dividir en diferentes regiones: asta dorsal, asta ventral y zona intermedia (Fig. 3). Básicamente las astas dorsales tienen funciones sensoriales, mientras que las astas ventrales funciones motoras. Por lo tanto, la médula es un gran centro de integración sensorio-motora. Las astas

dorsales y ventrales están formadas por distintos tipos neuronales y se organizan con una distribución diferente.

El asta dorsal presenta una función principalmente sensorial, ya que es donde se reciben las entradas desde las células de los ganglios de las raíces dorsales. Además, recibe entradas desde estructuras superiores (tronco del encéfalo, mesencéfalo y corteza cerebral) con función reguladora (Paxinos, "the rat nervous system" 3ªed.).

El asta ventral presenta una función fundamentalmente motora, ya que en esta zona de la sustancia gris se disponen principalmente motoneuronas y algunas interneuronas. Las motoneuronas presentan una distribución topográfica según los músculos que inervan: grupo central, medial y lateral. Esta región recibe entradas desde las fibras sensoriales primarias, desde láminas del asta dorsal y desde estructuras cerebrales como núcleos motores y reguladores del tronco del encéfalo y la corteza motora primaria. Todas las entradas sobre las motoneuronas contribuyen a generar y regular de forma coordinada el movimiento (Swett et al., 1986; Rivero-Melián, 1996).

La sustancia gris presenta una distribución laminar en la que se organizan diferentes tipos neuronales según su función (Fig. 3; Molander et al., 1984, 1989):

- En la lámina I, o estrato marginal, se encuentran neuronas de proyección, que reciben aferencias sensoriales de dolor y temperatura y envían sus axones a cruzarse a la comisura blanca ventral de la médula, para luego ascender por el cordón anterolateral hacia regiones superiores del sistema nervioso central.
- En la lámina II, o sustancia gelatinosa, abundan pequeñas neuronas que intervienen sobre las neuronas de proyección de otras láminas. Existe un grupo que recibe información nociceptiva y cutánea no nociceptiva.

- La lámina III está formada principalmente por interneuronas, aunque existen neuronas que proyectan hacia otras zonas de la médula, al tronco del encéfalo y a tálamo.
- La lámina IV, o núcleo sensorial propio, está formada por neuronas que conectan láminas superficiales de la médula con diferentes zonas del encéfalo. Existen neuronas que reciben señales de tacto y propiocepción, y otras que detectan temperatura y dolor.
- La lámina V está formada por neuronas que reciben tanto señales nociceptivas como no nociceptivas y conectan diferentes zonas medulares, y además estas células proyectan al encéfalo (Tronco del encéfalo, cerebelo y tálamo).
- La lámina VI está formada por neuronas que reciben información táctil y propioceptiva y alguna de sus neuronas conectan con las motoneuronas del asta ventral.
- La lámina VII, o zona intermedia de la sustancia gris, sólo existe en los niveles torácicos, cervicales bajos y lumbares altos, formando una columna neural que actúa de centro de relevo de la información propioceptiva inconsciente hacia el cerebelo.
- La lámina VIII está formada por neuronas de muchos tipos que principalmente tienen función local, aunque existen proyecciones a la formación reticular del tronco del encéfalo.
- La lámina IX está formada por motoneuronas que se encuentran distribuidas en varias columnas. Las columnas mediales inervan la musculatura axial y las columnas laterales inervan la musculatura de las extremidades.
- La lámina X, o sustancia gris periependimaria, rodea al canal ependimario de la médula. Está formada por neuronas que reciben información nociceptiva y que proyecta al tronco del encéfalo, tálamo e hipotálamo.

Las fibras gruesas que detectan tacto y propiocepción entran en la médula y se dirigen hacia la columna dorsal para ascender hasta los núcleos de las columnas dorsales (cuneatus y gracilis). A nivel de médula estas fibras dejan colaterales en la lámina II, III y IV donde se modula la entrada de otras informaciones sensoriales (interaccionando fundamentalmente con las neuronas que reciben la modalidad de dolor). Las fibras que detectan la modalidad propioceptiva dejan sus colaterales en el asta ventral donde contactan directamente con las motoneuronas e interneuronas, que permiten ejecución de diferentes reflejos.

Las fibras delgadas que detectan temperatura y dolor penetran en la médula, donde existen colaterales ascendentes y descendentes llegando a varios segmentos medulares próximos. A lo largo de ese recorrido dejan colaterales en la lámina I y II. Estas fibras también alcanzan las astas ventrales donde se producen reflejos activados por dolor (Delgado et al., "Manual de neurociencia").

La sustancia blanca también está dividida básicamente en 3 columnas: columna dorsal, columna lateral y columna ventral. En estas columnas se localizan los tractos ascendentes y descendentes que permiten la comunicación entre la médula espinal y el cerebro.

Las vías ascendentes son las fibras que conectan la médula espinal con diferentes estructuras en el cerebro para la transmisión de la información periférica. Las vías ascendentes son las siguientes:

- Vía de las columnas dorsales, sus axones se localizan dorsal y medial a lo largo de toda la médula de forma ipsilateral a su entrada, y finalizan en el tronco encefálico (Smith y Bennett, 1987).
- Tracto espinorreticular, sus axones se originan en las astas dorsales medulares y ascienden por la parte contralateral a su lugar de origen,

formando parte del funículo ventrolateral hasta alcanzar a distintos niveles la formación reticular (Zemlan et al., 1978).

- Tracto espinomesencefálico, cuyos axones se originan en las astas dorsales y tienen como destino el colículo superior ascienden a través del funículo lateral (Antonetty y Webster, 1975). En el caso en que las fibras tengan como destino la sustancia gris periacueductal ascienden a través de la columna ventrolateral y lateral (Clement et al., 2000).
- Tracto espinotalámico, cuyos axones se originan en las astas dorsales medulares y ascienden de forma contralateral al origen por el funículo ventral y ventrolateral hasta alcanzar diferentes núcleos talámicos (Giesler et al., 1981).

Las vías descendentes son fibras que conectan el encéfalo con la médula espinal con función motora y de neuromodulación sobre funciones sensoriales y motoras.

- Tracto corticoespinal, cuyos axones con origen cortical, cruzan la línea media y descienden a por la región más ventral de la columna dorsal, sobre el canal central (Armand, 1982). Además, existe un porcentaje de dicho tracto que no cruza la línea media y desciende por el funículo ventral (Brösamle y Schwab, 1997).
- Tracto rubroespinal, cuyos axones con origen en el núcleo rojo se distribuyen ventrolateralmente en el caso que proyecte a la zona lumbar, mientras que presenta una distribución dorsomedial cuando proyecta a la zona cervical (Daniel et al., 1987; Strominger et al., 1987).
- Tracto descendente neuromoduladores, cuyos axones tienen su origen en el locus coeruleus y núcleo de raphe. En el caso del tracto cuyo origen es el locus coeruleus sus axones descienden por el funículo ventral (Clark y Proudfit, 1991). Mientras que el tracto cuyo origen es el núcleo del

raphe, sus axones descienden a través del funículo dorsolateral (Bowker et al., 1982).

- Tracto reticuloespinal, cuyos axones se originan en diferentes niveles de la formación reticular del tronco del encéfalo, y se distribuyen bilateralmente a través del funículo ventral y lateral (Martin et al., 1985).

Por último, existe una parte importante de la sustancia blanca dedicada a la conexión de diferentes regiones medulares a través de las conexiones propioespinales las cuales se encargan de la modulación motora y nociceptiva (Cowley y Schmidt, 1997; Sandkuhler et al., 1993).

2.3.2. Tronco del encéfalo

El tronco del encéfalo se divide en 3 partes: una zona caudal o bulbo raquídeo, una zona intermedia llamada puente o protuberancia anular y una zona rostral o mesencéfalo. En esta tesis nos vamos a centrar en el bulbo y las estructuras que forman parte de la vía somatosensorial, por tanto que reciben tanto de la vía lemniscal como del tracto anterolateral.

En el bulbo se encuentran los núcleos de las columnas dorsales que es la primera zona de relevo para la vía de las columnas dorsales-lemnisco medial. Los núcleos de las columnas dorsales son dos, núcleo cuneatus y núcleo gracilis, que se disponen en la región caudal, medial y dorsal del bulbo. Reciben las señales desde las columnas dorsales que tiene su mismo nombre. Muestran una somatotopía general que consiste en que el núcleo gracilis recibe y procesa señales de las regiones más caudales (extremidades inferiores y tronco inferior) y el núcleo cuneatus recibe y procesa señales del tronco superior y extremidades superiores. Al mismo tiempo, tienen una organización somatotópica más detallada dentro de cada uno de los núcleos que se corresponde con la representación de los campos receptores del área corporal representada (Fig. 2; Nord, 1967; Maslany et al., 1991). Finalmente la región de la cara se encuentra representada en el núcleo principal del trigémino.

Dentro de los núcleos de las columnas dorsales existen 3 zonas: rostral, medial y caudal. La zona rostral es la zona que procesa la información propioceptiva, y además recibe aferencias desde las cortezas somatosensorial y motora (Chema et al., 1983; 1985), así como de la formación reticular, lo cual permite integración sensoriomotora a ese nivel (Leiras et al., 2010). Esta zona rostral presenta unas eferencias hacia tálamo (VPL y zona incierta), cerebelo, oliva inferior y médula espinal contralateralmente (Berkley et al., 1986).

La región medial de los núcleos de las columnas dorsales procesa la información cutánea y se subdivide a su vez en 3 zonas diferentes: 1) zona dorsal que se dispone en agregados neuronales, donde se encuentran neuronas de proyección e interneuronas; 2) zona ventral cuyas neuronas se disponen de forma reticulada, predominan las interneuronas pero también existen neuronas de proyección hacia a la médula espinal, el mesencéfalo rostral y hacia el borde entre núcleo talámico ventroposterior lateral y el núcleo ventral lateral del tálamo (Berkley et al., 1986); 3) zona medial que está implicada en el procesamiento tanto de la modalidad de tacto como propiocepción (Canedo, 1997).

La región caudal de los núcleos de las columnas dorsales recibe tanto información táctil como propioceptiva, y también recibe aferencias corticales (Kuypers, 1958; Kuypers y Tuerk, 1964; Cheema et al., 1983). Sus proyecciones coinciden con las de la región rostral, por lo que se piensa que se tiene un papel en el control postural.

Como se ha descrito anteriormente, en el tronco del encéfalo se localizan estructuras que reciben del tracto anterolateral, bien sea directamente (tracto espinorreticular, tracto espinomesencefálico) o bien sea por colaterales del tracto espinotalámico. Las estructuras que se alcanzan están implicadas tanto en integración sensoriomotora, como en regulación del dolor. Estas estructuras a las que nos referimos son la formación reticular (Peterson et al., 1976; Faingold y Stittsworth, 1980), el locus ceruleus (Cedarbaum y Aghajanian, 1978;

Aston-Jones y Bloom, 1981a; Elam et al., 1986; Hirata y Aston-Jones, 1994), y el núcleo de rafe (Moolenaar et al., 1976; Springfield y Moolenaar, 1983; Waterhouse et al., 2004).

2.3.3. *Tálamo somatosensorial*

El tálamo dorsal es la mayor masa de sustancia gris diencefálica, su desarrollo está íntimamente ligado al desarrollo de la corteza cerebral y en él se originan casi todas las salidas del diencefalo a la corteza cerebral. El tálamo interviene en el procesamiento de todo tipo de información - motora, límbica y sensorial - pero en esta tesis nos centraremos en los núcleos talámicos que forman parte de la vía somatosensorial. Estos núcleos se pueden clasificar según la relación existente con la corteza cerebral:

- Los núcleos específicos o núcleos de relevo reciben información sensorial de otras estructuras a través de las diferentes vías sensoriales y la envían a la corteza cerebral. Aunque clásicamente se denominan “núcleos de relevo” tienen un papel importante en el procesamiento y selección de la información sensorial, que finalmente alcanza la capa IV del área cortical específica que corresponda a cada vía sensorial. Los núcleos somatosensoriales específicos del tálamo dorsal son los que forman el complejo ventrobasal que está formado a su vez por el núcleo ventral posterior lateral (VPL) y el núcleo ventral posterior medial (VPM).

- Los núcleos no específicos o núcleos de asociación, reciben la aferencia más importante desde la corteza cerebral, y al mismo tiempo proyectan a la corteza además de recibir entradas y salida de otros núcleos talámicos (Castro-Alamancos y Connors, 1997; Sherman y Guillery, 2001 “Exploring the thalamus and its role in cortical function”, 2ªed.). Se pueden dividir en núcleos intralaminares, que proyectan a la capa V-VI, y núcleos mediales, que proyectan fundamentalmente a la capa I y III.

A continuación nos centraremos en la descripción del tálamo somatosensorial, que se compone del complejo ventrobasal y el núcleo posterior medial. Además debemos tener en cuenta que los núcleos intralaminares y los mediales también reciben aferencias del tracto espinotalámico.

El complejo ventrobasal se compone de: 1) el núcleo ventral posterior lateral (VPL) que recibe señales procedentes del tronco y extremidades del animal (Emmers, 1988); 2) el núcleo ventral posterior medial (VPM) que recibe señales de la región rostral de la cabeza (del cual se hablará más adelante) (Fig.3; Waite, 1973). Por tanto el complejo ventrobasal tiene una organización somatotópica como todas las estructuras de la vía, y el animal se encuentra representado básicamente con la región rostral orientada hacia la línea media (donde está el VPM) y a medida que nos desplazamos caudalmente a lo largo del cuerpo, se encuentran en el VPL lateralmente las representaciones de tronco y extremidades (VPL) (Aguilar et al., 2008; Francis et al., 2008). Dentro del complejo ventrobasal existen neuronas de proyección hacia la corteza somatosensorial (neuronas de tercer orden) e interneuronas de circuito local que tienen la función de procesar y filtrar señales ascendentes. Además, existe una estructura talámica asociada al complejo ventrobasal, y a todos los núcleos de vías sensoriales primarias, que es el núcleo reticular talámico (NRT). El NRT está compuesto por neuronas gabaérgicas, que envían sus axones hacia los núcleos sensoriales primarios, por lo tanto realizan una función de filtrado y modulación de la información ascendente, al mismo tiempo participan en la generación de actividad espontánea como ritmicidad y sincronía (Steriade y Llinás, 1988). El NRT es un núcleo que recibe información directa desde las neuronas tálamo-corticales y desde la corteza sensorial específica del sistema sensorial en el que están implicadas sus neuronas. En el caso de roedores no existen interneuronas en el complejo ventrobasal (Barbaresi et al., 1986; Price,

1995, 2ªed. "The rat nervous system"; Arcelli et al., 1997) por lo que toda actividad inhibitoria proviene del NRT.

Las neuronas de proyección tálamo-corticales son por tanto las neuronas de tercer orden. Estas células, al mismo tiempo que envían el axón hacia la corteza cerebral, dejan una colateral en el NRT que permitirá a este núcleo obtener una copia de todo lo que alcanza la corteza. El VPL así como el NRT están regulados por las entradas corticales desde capa VI (se describirá más adelante), así como por los sistemas de neuromodulación generales (ACh, NE, 5-HT, DA etc) (Bajic y Proudfit, 1999, Guilbaud et al., 1977; Lee y Beitz, 1993). Las neuronas tálamo-corticales envían los axones a través de la radiación talámica hacia la corteza somatosensorial primaria haciendo sinapsis principalmente en la capa IV cortical. La información somatosensorial que ha llegado a la corteza se distribuirá y se procesará para llegar a la percepción consciente de lo que está ocurriendo.

El núcleo posterior medial (Pom) recibe tanto desde la vía lemniscal, como desde el tracto espinotalámico (Landisman y Connors, 2007; Iwata et al., 1992; Cadusseau y Roger, 1992) y está regulado de forma importante por las entradas inhibitorias de la zona incierta (Boivie, 1979; Masri et al., 2009). Este núcleo envía sus axones hacia prácticamente todas las capas de la corteza somatosensorial primaria (Viaene et al., 2011), y recibe entradas corticales desde la capa V (Veinante et al., 2000). Algunos autores lo proponen como un núcleo en el que se regula la información nociceptiva (Masri et al., 2009; Masri y Keller, 2012).

Los axones espinotalámicos, por tanto, alcanzan tanto el tálamo lateral como el tálamo medial. Dentro las dianas del tracto en el tálamo lateral como hemos mencionado anteriormente se incluyen el núcleo ventral posterolateral (VPL) y núcleo talámico posterior (Po), mientras que entre las dianas dentro del tálamo medial se encuentran el núcleo central lateral y el núcleo submedial (Cliffer et al., 1991; Craig y Burton, 1981; Lund y Webster, 1967; Peschanski et

al., 1983; Zemlan et al., 1978). El núcleo central lateral presenta proyecciones hacia el sistema límbico, que son proyecciones ascendentes, mientras que el núcleo submedial se encarga de modular el dolor a nivel espinal (Paxino, “the rat nervous system” 3ªed.)

El tálamo somatosensorial y el NRT son modulados por diferentes núcleos del tronco del encéfalo: la formación reticular del tronco, que envía axones con terminales colinérgicas hacia los núcleos del tálamo; el locus ceruleus, que libera norepinefrina; el núcleo de rafe, que libera serotonina. Todas las entradas neuromoduladoras contribuyen al procesamiento de información a nivel talámico, cambiando las propiedades espacio-temporales de los campos receptores en las neuronas tálamocorticales (Aguilar y Castro-Alamancos, 2005). El resultado final es una modulación de la información somatosensorial que llega a corteza cerebral dependiendo de los estados de comportamiento del individuo.

Una vez que la información alcanza la corteza cerebral, se distribuye desde las áreas primarias al resto de las estructuras corticales y subcorticales. Esto sugiere que la corteza tiene una capacidad de integrar la información exterior que recibimos y a su vez regular la actividad subcortical como una respuesta adecuada.

2.3.4. Corteza somatosensorial:

2.3.4.1. *Generalidades*

La corteza cerebral cubre la superficie de los hemisferios cerebrales y alcanza su máximo desarrollo en los primates, sin embargo es también la parte más desarrollada del cerebro en roedores. Tanto desde el punto de vista estructural como filogenético, se distinguen tres tipos básicos de corteza:

- La arquicortex es la primera corteza en aparecer en la evolución y actualmente constituye la formación del hipocampo.

- La paleocortex comprende el cerebro olfativo, y sus diversas regiones poseen un número variable de capas, hasta 10.

- La isocortex o neocortex es la última corteza que aparece en la evolución y en diferentes regiones de la misma se ven representadas las funciones más complejas y/o modernas. Está estructurada básicamente en 6 capas. Gran parte de la neocorteza se encarga fundamentalmente del procesamiento de la información sensorial o de la emisión de órdenes motoras. Cada modalidad sensorial es determinada por varias áreas especializadas con diferentes funciones en el procesamiento de la información. Estas áreas se conocen como áreas sensoriales primarias porque reciben directamente aferencias de los núcleos específicos del tálamo (Herkenham, 1980; Kharazia y Weinberg, 1994). Las áreas secundarias o terciarias, también llamadas áreas de asociación, integran la información de diferentes vías sensoriales englobando entradas aferentes desde tálamo y desde áreas corticales primarias. Diferentes autores se han encargado de clasificar las regiones corticales según la función que presentan, siendo la más utilizada y popular la clasificación de Brodmann (Brodmann, 1909). Varias regiones de Brodmann pueden pertenecer a una misma área cortical encargada de una función definida: así, por ejemplo, la corteza somatosensorial primaria (SI) abarca las tres primeras regiones de Brodmann (1, 2 y 3); la corteza visual primaria (VI) abarca la región de Brodmann 17.

En el neocortex se encuentra la corteza somatosensorial primaria, que es objeto de estudio de este trabajo y por tanto es la corteza que vamos a describir con un mayor detalle en esta tesis.

2.3.4.2. Corteza somatosensorial primaria (SI)

En humanos la corteza somatosensorial primaria se dispone en la circunvolución postcentral del lóbulo parietal (Área 1, 2 y 3 de Brodmann), y aunque en roedores no existen marcas macroanatómicas que definan su

localización se ha demostrado que tiene una representación homóloga a la de humanos (Chapin and Lin 1984; Seelke et al., 2012). Esta corteza recibe las proyecciones de los núcleos talámicos específicos a los que llega la vía lemniscal y desde los núcleos no específicos a los que llega la vía espinotalámica.

La información propioceptiva y de presión alcanza las áreas 3a y 2, la información táctil y termoalgésica tiene como destino las áreas 3b y 1. Además, estas áreas se encuentran interconectadas por proyección intracorticales. La corteza somatosensorial primaria conecta de forma recíproca con los núcleos talámicos, corteza motora y premotora, y con la corteza somatosensorial secundaria (SII).

La corteza somatosensorial secundaria se dispone en una porción del área 2 de Brodmann en relación con las áreas 5, 7 y 40 del lóbulo parietal y recibe las proyecciones de los núcleos talámicos VPM, VPL, LP y Po y de la corteza somatosensorial primaria de ambos hemisferios. Y de ella existen salidas hacia la corteza somatosensorial primaria, corteza motora y premotora, así como hacia áreas corticales asociativas de la corteza parietal posterior, que recibe además proyecciones de otras modalidades sensoriales. Se piensa que la corteza somatosensorial secundaria es la salida hacia el sistema límbico (amígdala e hipocampo).

Todo el isocortex y en concreto las cortezas sensoriales primarias se organizan en 6 capas. Las capas corticales se enumeran desde la piamadre en la zona más dorsal (capa I) hasta la zona más ventral en el inicio de la sustancia blanca (capa VI). Bajo la capa VI aparece la sustancia blanca, que limita directamente con el ventrículo lateral o con los núcleos telencefálicos. De la capa I – III se denominan capas supragranulares, la capa IV es la capa granular y la capa V y VI son las capas infragranulares.

Las capas corticales se determinan según su aspecto citoarquitectónico y por la composición en distintos tipos de neuronas, así como las conexiones que reciben desde estructuras subcorticales y las que mantienen con otras regiones

corticales. Atendiendo a estos criterios se clasifican de la siguiente forma (M.Abeles, Neuronal circuits of the cerebral cortex, ed. Cambridge University Press, 1991):

- La capa I, o capa molecular, contiene pocas células y está compuesta fundamentalmente por las terminaciones dendríticas de neuronas piramidales y axones que corren en diferentes direcciones lo que le da un aspecto de punteado al microscopio.

- La capa II o capa granular externa, está compuesta por células pequeñas, estrelladas o piramidales.

- La capa III, o capa piramidal externa, está compuesta por células piramidales de mayor tamaño que en la capa anterior. La entrada más importante que recibe es a través de fibras del cuerpo calloso, por tanto con origen en el hemisferio contralateral. También recibe entradas de menor importancia de tipo tálamo-cortical en la región basal cerca de la capa IV. Tiene proyecciones locales, proyecciones que se envían hacia el hemisferio contralateral a través del cuerpo calloso y de forma vertical hacia las capas inferiores de su columna.

- La capa IV, o capa granular interna, es rica en células estrelladas que pueden ser excitatorias e inhibitorias y de ahí el aspecto granular. Las células estrelladas espinosas (por la cantidad de espinas dendríticas que tiene) son de tipo excitador mientras que las estrelladas no espinosas son inhibitorias. La entrada principal proviene de los núcleos talámicos específicos, siendo por tanto la capa que recibe la información sensorial directamente. Las células excitadoras de esta capa envían sus axones a las capas 3 y 5 de forma topográfica y precisa, es decir, limitada a su columna cortical.

- La capa V, o capa piramidal interna, presenta todo tipo de células pero se caracteriza por la presencia de células piramidales de gran tamaño. La entrada predominante a las neuronas piramidales de esta capa proviene de las conexiones sobre sus dendritas apicales en capas superiores, y otras entradas

de largo alcance. Las células piramidales de esta capa proyectan a un gran número de estructuras subcorticales como los núcleos no específicos del tálamo, colículo superiores, formación reticular del tronco del encéfalo, núcleo rojo, núcleo de las columnas dorsales y médula espinal entre otras dianas, además de hacia otras áreas corticales y a la corteza contralateral (Canedo, 1997).

- La capa VI, o capa multiforme, presenta neuronas piramidales con soma elongado o fusiforme. En esta capa cortical existe una conexión recíproca con los núcleos del tálamo específico y a través de colaterales con los inespecíficos, además de conexiones cortico-corticales como con la corteza motora, somatosensorial secundaria y la corteza perirrinal. Estas conexiones se llevan a cabo por 3 tipos celulares diferentes: células cortico-talámicas, células cortico-corticales y células de circuitos locales (Zhang y Deschenes, 1997; 1998). Dentro de las células cortico-talámicas se encuentran las células que proyectan a los núcleos específicos (VPM y VPL) y al núcleo reticular talámico (NRT). Existe una población heterogénea cortico-cortical cuya principal diana es la conexión con la corteza motora y la somatosensorial secundaria además de conectar con las diferentes capas de la propia corteza.

2.3.4.3. Clases de neuronas corticales

La corteza somatosensorial primaria se caracteriza por presentar dos tipos principales de neuronas según el neurotransmisor que liberan (Henny y Jones, 2008): excitadoras (células piramidales y estrelladas con espinas) e inhibitoras (células canastas, células candelabro, células dendríticas de doble ramo, célula neurogliforme y célula de Martinotti). Esa clasificación responde a estudios histológicos que han utilizado diferentes marcadores. Para identificar las neuronas inhibitoras se utilizan enzimas como GAD (ácido glutámico descarboxilasa), VGAT (transportador vesicular de GABA), y proteínas quelantes de calcio (parvalbumina y calbindina). Para identificar las neuronas excitadoras,

se utilizan tinciones que muestran la morfología celular por inyección de colorantes (forma piramidal) o marcadores histológicos como VGlut (transportador vesicular de Glutamato) (Fujiyama et al., 2001).

Otra forma de clasificación utilizada es según el comportamiento electrofisiológico que presentan dichas neuronas en respuesta a la aplicación intracelular de corrientes despolarizantes e hiperpolarizantes. Según esta clasificación existen 4 tipos principales de neuronas, lo cual se ve consensuado en la mayoría de los trabajos electrofisiológicos (McCormick et al. 1985; Contreras, 2004; Steriade, 2004):

- Las células “regular-spiking” (RS) se caracterizan por responder a los pulsos despolarizantes con un alto grado de adaptación en la frecuencia de descarga. Presentan una larga hiperpolarización postdescarga y una duración media de la espiga de 0.6- 1ms. Se encuentran distribuidas en todas las capas que forman la corteza somatosensorial y tienen una función excitadora.

- Las células “intrinsically-bursting” (IB) se caracterizan por responder a pulsos despolarizantes con un brote de 3 a 5 potenciales de acción seguido por una hiperpolarización postdescarga de larga duración. Después de esta respuesta inicial, pueden continuar generando brotes o simples potenciales de acción similar a las regular-spiking dependiendo del pulso al que se sometan. Se encuentran en la capa IV y en la zona superficial de la capa V y presentan una función excitadora.

- Las células “fast-spiking” (FS) se caracterizan por responder a pulsos despolarizantes con potenciales de acción de corta duración y una repolarización muy rápida, presentan una hiperpolarización postdescarga muy pronunciada en voltaje y de corta duración, que le permite responder con alta frecuencia de potenciales de acción sin adaptación. Se encuentran distribuidas en todas las capas que constituyen la corteza somatosensorial y presentan una función inhibitoria.

- Las células “fast-rhythmic-bursting” (FRB) se caracterizan por responder a pulsos despolarizantes con brotes de 2 a 5 potenciales de acción con una alta frecuencia de disparo. El potencial de acción es de corta duración y presenta una hiperpolarización postdescarga pequeña seguida de despolarización que genera un nuevo brote de potenciales de acción. Con este tipo de disparo existen neuronas que funcionan como excitadoras pero también hay neuronas que actúan de inhibidoras.

Como estamos describiendo, la visión general de la corteza somatosensorial primaria se caracteriza por presentar una organización en diferentes capas que a su vez se forman por diferentes tipos de neuronas que conectan entre ellas. El conjunto de conexiones entre capas y regiones corticales se materializa en conexiones neuronales (sinapsis excitadoras e inhibitorias) que generan una actividad cortical fisiológica natural. Esta actividad cortical está determinada por las propiedades intrínsecas neuronales, las conexiones intracorticales y las entradas de estructuras subcorticales.

La actividad cortical ha sido estudiada de forma separada y ha sido clasificada en espontánea y evocada, sin embargo a nivel de individuo esta separación es imposible. A continuación se describe brevemente la componente de actividad espontánea y evocada que encontramos en la corteza somatosensorial en cada momento.

2.3.4.4. Actividad cortical espontánea

Los primeros registros electrofisiológicos (EEG, electroencefalografía) se realizaron en humanos donde se caracterizó la actividad cortical existente en relación con los estados de comportamiento de la persona (Berger en 1929 (Tudor et al., 2005)). Loomis en 1935 estableció la primera clasificación de las etapas de vigilia y de sueño en humanos, que se definen según determinados rangos de frecuencias:

- El estado de vigilia se caracteriza por ondas rápidas de bajo voltaje por encima de los 13Hz (actividad β) cuando el individuo esta activo o con los ojos abiertos. Hay aparición de ritmo α (8-12 Hz) cuando el individuo está en reposo pero despierto y con los ojos cerrados.
- En el estado de sueño se han descrito fases concretas asociadas a rangos distintos de frecuencias:

- La fase 1 se caracteriza por una actividad con ondas rápidas con bajo voltaje entre las que aparecen ondas más lentas de pequeño voltaje dentro de la banda de frecuencia theta (4-7Hz). Esta fase aparece cuando el individuo se encuentra adormilado.

- La fase 2 se caracteriza por la aparición en el EEG de husos de sueños (brotes de ondas de la banda α (8-12Hz) que duran 1segundo) y/o complejos K (ondas bifásicas de gran voltaje). Esta fase aparece cuando el individuo se encuentra un sueño ligero.

- La fase 3-4 se caracteriza por la presencia de ondas lentas de gran voltaje dentro de la banda de frecuencias δ (1-3Hz) si es la fase 3 y banda de frecuencia de onda lenta (<1Hz) si es la fase 4. Esta fase aparece cuando el individuo se encuentra en un sueño profundo.

- La fase REM se caracteriza por presentar rango de frecuencias a la fase 1 descrita anteriormente a nivel electrofisiológico pero lo único que la diferencia es el movimiento ocular rápido que sucede en esta fase del sueño. Esta fase aparece cuando el individuo tiene sueño profundo y movimiento rápido ocular.

Existe un rango de frecuencia de 20-60Hz denominado beta/gamma que sucede tanto en fase REM como durante vigilia (Llinás y Ribary, 1993; Steriade et al., 1996). También se ha estudiado este rango de frecuencia en los estados activados (UP state) durante la actividad cortical en onda lenta (Ruiz-Mejias et al., 2011).

Las diferentes bandas de frecuencias que caracterizan la actividad cortical se han estudiado in vivo e in vitro, donde se pueden observar las mismas

frecuencias que hemos mencionado en el sueño natural (Pagliardini et al., 2012; Friedberg et al. 1999; Erchova et al., 2002), tanto las frecuencias rápidas (Steriade et al., 1996; Llinás y Rybary, 1993) como las lentas (Steriade et al., 1993; Compte et al., 2003; Chauvette et al., 2010).

El estudio de la actividad cortical en onda lenta ha recibido mucha atención en la literatura, ya que tiene la capacidad de mostrar dos estados diferentes: un estado silente o DOWN y un estado activado o UP, que de forma global representa la actividad en onda lenta observada durante sueño natural. Los estados activados han sido muy estudiados porque muestran una actividad similar a la observada en vigilia o sueño ligero (Ruiz-Mejias et al., 2011; Destexhe et al., 2007). Es importante destacar que la actividad cortical en onda lenta en animales anestesiados depende del tipo de anestésicos que se utilice, es decir, tendrá un rango de frecuencia u otro dependiendo del anestésico dentro del rango general descrito anteriormente (Crunelli y Hughes, 2010).

La actividad en onda lenta es un ritmo propio de la corteza ya que se ha descrito que la corteza aislada es capaz de producir dicha actividad (Steriade, Nuñez et al., 1993; Steriade, Contreras et al., 1993; Yuste et al., 2005). Pero esta actividad cortical es influenciada por las entradas que recibe de tálamo (Crunelli y Hughes, 2010; Timofeev et al., 2000) y de los núcleos reguladores del tronco y prosencéfalo basal (Moruzzi y Magoun, 1949; Lindvall et al., 1974; Hobson et al., 1975; Aston-Jones y Bloom, 1981a,b; Satoh y Fibiger, 1986; Fox y Armstrong-James, 1986; Hallanger et al., 1987; Steriade et al., 1990; Aguilar y Castro-Alamancos, 2005).

La actividad cortical espontánea, como se ha descrito, se caracteriza por diferentes rangos de frecuencias en individuos sanos. Además, existe un alto grado de sincronía entre distintas regiones del cerebro, tanto a nivel intracortical como entre la corteza y estructuras subcorticales (Massimini et al., 2004; Steriade, 1997; Mariño et al., 2000; Mariño et al., 1999). Cuando suceden alteraciones o modificaciones de las frecuencias que predominan en cada

estado, o bien de la sincronía entre estructuras cerebrales, se producen diferentes estados patológicos (Schulman et al., 2011; Walton y Llinás, 2010).

2.3.4.5. Actividad cortical evocada

La actividad cortical evocada es la activación neuronal que aparece cuando las señales de estímulos periféricos alcanzan la corteza somatosensorial. La estimulación de diferentes regiones corporales activa diferentes regiones corticales, existiendo una correspondencia espacial entre la superficie corporal y la corteza cerebral. Esto fue puesto de manifiesto por Penfield en 1937 (Pogliano, 2012), cuyo trabajo mostró que al estimular eléctricamente diferentes zonas corticales en un paciente, éste asociaba la sensación originada en una parte concreta del cuerpo con cada zona cortical estimulada. Esta representación de la superficie corporal en la corteza cerebral se denomina somatotopía.

El estudio de la actividad cortical evocada en el sistema somatosensorial ha sido abundante y detallado tanto en primates (Talbot et al., 1968; Mountcastle et al., 1990) como en roedores (Woolsey et al., 1975; Chmielowska et al., 1989). Estos estudios han facilitado la caracterización del campo receptor en el sistema somatosensorial, y han descrito el comportamiento neuronal ante una gran diversidad de estímulos. Además, estudios más recientes han puesto de manifiesto la diversidad de respuestas corticales ante estímulos aplicados en diferentes regiones corporales, fuera del campo receptor clásico descrito (Foffani et al., 2004; Moxon et al., 2008).

Se ha demostrado en los sistemas sensoriales en general y en el sistema somatosensorial en particular que la actividad espontánea modula la actividad evocada, de forma que cambia las propiedades espaciotemporales de los campos receptores (Erchova et al., 2002; Rivadulla et al., 2003). Específicamente, se ha demostrado la relación entre la respuesta evocada y el estado del sistema a nivel de la corteza somatosensorial primaria, en trabajos

que comparan las respuestas evocadas durante actividad de onda lenta (Petersen et al., 2003; Civillico y Contreras, 2012) o en diferentes estados de anestesia (Erchova et al., 2002; Friedberg et al., 1999).

Todos los componentes descritos en esta introducción: la organización del sistema como unidad, la actividad cortical espontánea y evocada, y las propiedades intrínsecas de las neuronas, nos permiten entender el funcionamiento del sistema en condiciones naturales. Estos conocimientos han formado la base del estudio de patologías afectan al sistema somatosensorial. Principalmente, en el sistema somatosensorial se han estudiado desaferentaciones tanto periféricas como centrales.

2.4. Daño y patología del sistema somatosensorial

Un daño en una estructura a cualquier nivel del sistema somatosensorial deriva generalmente en una mala función del sistema, y finalmente en un conjunto de factores que definen diferentes patologías asociadas al daño.

Existe un gran número de posibles problemas que producen el daño directo del sistema somatosensorial: ictus, procesos desmielinizantes, amputación traumática, lesión medular completa o incompleta, desarrollo de tumores etc. Por lo tanto, la diversidad de origen del daño así como las diferentes combinaciones de estructuras que se dañen hacen que las patologías que se desarrollen sean muy complejas. Sin embargo, todos los síntomas y los mayores problemas que caracterizan el daño del sistema somatosensorial se podrían agrupar en: 1) problemas de integración sensorio-motora; 2) parestesia o falta de percepción somatosensorial de grandes regiones corporales; 3) desarrollo de dolor neuropático; 4) aparición de miembro o sensación fantasma.

Los dos primeros problemas son productos de los efectos directos e inmediatos del daño sobre las estructuras del sistema somatosensorial, son debidos a la propia desaferentación. Los dos segundos problemas son productos

de una evolución temporal que lleva a fenómenos de plasticidad y reorganización anatómica y fisiológica en diferentes estructuras del sistema. Sin embargo, no son fenómenos separados, ya que puede existir una relación entre todos ellos.

En el caso de la lesión medular, completa o incompleta, el dolor se ha relacionado con procesos de cambio a lo largo del tiempo en las estructuras del sistema nervioso central, bien sea sobre los tractos ascendentes, astas dorsales en la médula espinal, o en las estructuras del tronco del encéfalo, el tálamo somatosensorial o la corteza somatosensorial (Chen et al., 2002; Kaas et al., 2008). Los cambios a nivel de corteza somatosensorial están muy descritos en pacientes donde se observó esta reorganización a largo plazo después de lesión medular con diferentes técnicas (Bruehlmeier et al., 1998; Green et al., 1998; Curt et al., 2002). La reorganización cortical a largo plazo se ha relacionado con patologías como la sensación o miembro fantasma (Moore et al., 2000; Simoes et al., 2012) y el dolor neuropático (Wrigley et al., 2009; Gustin et al., 2012). Para adentrarse en los mecanismos causantes de dichos efectos en los pacientes ha sido necesaria la utilización de modelos animales como primates y otros animales donde se puede abordar cada estructura que forma el sistema somatosensorial. Los estudios con primates se han realizado con dos tipos de abordajes: con lesión medular (Jain et al., 1997, 2008; Tandon et al., 2009; Pons et al., 1991) y con lesión periférica (Merzenich et al., 1983a y b; Calford y Tweedale 1991a y b; Florence et al., 1998). Ambos abordajes muestran la reorganización cortical como un aumento de la respuesta en la zona cortical desaferentada al estímulo de la zona corporal intacta. La reorganización cortical tiene un desarrollo a largo plazo después de la lesión, y en primates también se ha relacionado con la aparición de dolor neuropático (Flor et al., 1995; Lotze et al., 1999; Klit et al., 2009).

Se han realizado estudios sobre reorganización cortical en otros modelos animales como mapache (Kelahan y Doetsch, 1984; Turnbull y Rasmusson,

1990), murciélago (Calford y Tweedale, 1988, 1991a) y roedores (Wall y Cusick, 1984; Cusick et al., 1990; Byrne y Calford, 1991; Doetsch et al., 1996; Faggín et al., 1997) que confirman la reorganización a nivel cortical a largo plazo. Hay que tener en cuenta que bajo la expresión “largo plazo” se engloba un rango muy amplio de tiempo, siendo difícil definir el inicio de los procesos. Los modelos experimentales que han utilizado roedores para el estudio de la lesión medular han permitido conocer cambios corticales con un rango de tiempo menor, hablamos de días (Wall y Egger, 1971; Endo et al., 2007; Ghosh et al., 2009, 2010). Sin embargo, no existen datos sobre los cambios inmediatos que suceden a nivel cortical después de lesión medular y que puedan ser considerados una reorganización.

La reorganización cortical se ha definido como el aumento de la respuesta en la zona cortical desaferentada ante el estímulo de la zona corporal intacta después de una lesión en el sistema nervioso. Existen pocos trabajos que han estudiado los efectos de una lesión medular sobre el área cortical intacta adyacente al área afectada. En este sentido, sólo un trabajo ha mostrado en humanos cambios en la corteza motora (Curt et al., 2002). Es necesario el estudio de la región cortical adyacente a la región desaferentada con el fin de profundizar en el fenómeno de reorganización.

La reorganización se ha estudiado desde el punto de vista de los cambios en las respuestas evocadas a nivel cortical. Pero, existen patologías del sistema nervioso central que se asocian a cambios en el patrón de frecuencias de la actividad espontánea, como el parkinson, la disritmia motora y de forma importante el dolor neuropático (Walton y Llinás, 2010). Teniendo en cuenta que existe una relación entre la actividad espontánea a cualquier nivel del sistema y las respuestas evocadas que allí se producen, es posible que parte de los cambios de las respuestas evocadas (que se consideran reorganización cortical) pueden verse influenciados por la actividad espontánea. Sin embargo,

no existen trabajos que describan los efectos de una lesión medular sobre la actividad espontánea cortical.

Es importante estudiar los procesos fisiológicos que suceden de forma inmediata a una lesión medular a nivel cortical, así como los efectos sobre la región cortical intacta adyacente a la dañada y la contribución de la actividad espontánea en el fenómeno de reorganización, para entender los mecanismos tempranos que subyacen a la reorganización cortical después de la desaferentación con el fin de desarrollar intervenciones que pueda evitar patologías y optimizar la recuperación (Engineer et al., 2011).

3. OBJETIVOS

La lesión medular es un problema del sistema nervioso central que afecta a un gran número de personas anualmente. Hasta hoy no hay una solución clínica o una curación para el enfermo de lesión medular, por lo que las personas afectadas sufren un proceso de evolución de la enfermedad hacia un estado crónico. El efecto más evidente en personas con lesión medular es la falta de movilidad voluntaria. Pero existe una gran cantidad de problemas clínicos asociados al daño del sistema somatosensorial que a largo plazo derivan en patologías como el dolor neuropático y el miembro fantasma. Estos efectos adversos descritos a largo plazo se han relacionado con un fenómeno fisiológico denominado reorganización, el cual puede suceder a diferentes niveles del sistema somatosensorial. Los trabajos relacionados con la reorganización realizados tanto en humanos como en modelos animales se han centrado principalmente en la corteza. El tiempo mínimo en el que se ha obtenido evidencia de una reorganización cortical posterior a una lesión medular es de 3 días según se muestra en los trabajos con modelos animales. Por tanto, **el objetivo general de esta tesis es determinar si existen cambios fisiológicos a nivel cortical que aparezcan de forma inmediata después de una lesión medular.**

A partir de este objetivo general, el estudio de los efectos inmediatos, existen dos cuestiones que no se han resueltos en estudios previos: los resultados obtenidos se han centrado en las respuestas corticales de la zona desaferentada ante el estímulo de la zona corporal intacta, pero no se ha abordado la posibilidad de la existencia de efectos sobre la corteza somatosensorial intacta; 2) los estudios sobre lesión medular a nivel cortical sólo se han centrado en la actividad evocada por estimulación periférica, sin embargo existen patologías en el sistema nervioso central donde se ha observado una modificación de la actividad espontánea en las estructuras implicadas.

Estas dos cuestiones abiertas nos permitieron abordar el objetivo principal mediante **dos objetivos específicos**:

- 1) Estudio de la actividad espontánea y evocada por estímulos eléctricos de la corteza somatosensorial primaria antes y después de una lesión medular completa a nivel torácico
- 2) Estudio de los cambios corticales independientes del estado de la actividad espontánea después de la misma lesión medular completa a nivel torácico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados conforme la Normativa del Consejo Internacional de Ciencia para los animales de laboratorio, según la regulación de la Unión Europea 86/609/EEC y 2010/63/EU, y fueron aprobados por el comité ético para la investigación animal del Hospital Nacional de Parapléjicos (Toledo, España).

Para llevar a cabo este estudio se utilizó un total de 64 ratas Wistar macho, que se dividieron en diferentes grupos experimentales:

1) Para el estudio del primer objetivo, “estudio de los cambios en la actividad espontánea y evocada de la corteza somatosensorial primaria antes y después de una lesión medular”, se utilizaron 31 ratas anestesiadas que se dividieron a su vez en 3 grupos. En el grupo principal, se utilizaron 14 animales con registros en la corteza somatosensorial primaria sobre la representación de la garra delantera (Forepaw, FP) y de la garra trasera (Hindpaw, HP), partiendo de un estado de anestesia ligera III-3 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al. 2002). Una vez realizado el protocolo de estimulación inicial se llevó a cabo una lesión medular completa a nivel de T9-T10 y se repitió el protocolo de estimulación. En un segundo grupo de 8 animales, con las mismas zonas corticales de registro y el mismo estado de anestesia del grupo anterior, se llevó a cabo un bloqueo farmacológico de la médula espinal en lugar de una lesión medular (desaferentación sin daño físico de la médula espinal). Finalmente se utilizó un tercer grupo de 9 animales como experimento control, con las mismas zonas de registros en la corteza de garra delantera y trasera, permaneciendo intacta la médula espinal (experimento control durante anestesia ligera).

2) Para el segundo objetivo de esta tesis, “cambios corticales independientes del estado después de una lesión medular completa”, se utilizaron 33 ratas anestesiadas que se dividieron en diferentes grupos experimentales. En este caso, en el grupo principal se utilizaron 12 animales con

registros en la corteza somatosensorial primaria en la zona perteneciente a la garra delantera y trasera. Cada uno de estos animales se sometió a 3 condiciones experimentales diferentes: 1) animal intacto en un estado de anestesia ligera III-3 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al. 2002); 2) animal intacto en un estado de anestesia profunda III-4 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al. 2002) y; 3) animal sometido a lesión medular completa. Además de este experimento principal se llevaron a cabo experimentos adicionales que actuaron de control sobre diversos aspectos anatómicos y funcionales. En un grupo de 8 animales, se realizaron registros de la corteza somatosensorial perteneciente a las vibrisas del animal, además de los 2 electrodos situados en las zonas corticales habituales (FP y HP). En estos animales se partió de un estado de anestesia profunda III-4 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al. 2002) y se realizó una lesión medular completa a nivel torácico. También se realizó otro grupo experimental de 8 animales en el que se hicieron registros de la corteza perteneciente a la garra delantera y trasera pero manteniendo intacta la médula espinal, en este caso todo el experimento se llevó a cabo en un estado cortical de anestesia profunda (estado de anestesia III-4), con el fin de determinar los posibles efectos de la anestesia. Finalmente se realizó un experimento adicional en un grupo de 5 animales en los que se hicieron registros simultáneos, intracelulares (o yuxtacelular) y extracelulares en el área cortical correspondiente a la garra trasera y delantera respectivamente, para el estudio de los cambios a nivel celular inmediatamente después de una lesión medular completa.

4.1. Protocolo experimental

Todos los animales fueron anestesiados con uretano (1.5 g/Kg, Sigma-Aldrich) mediante una inyección intraperitoneal. La temperatura corporal de los animales se mantuvo constante en torno a 36.5°C utilizando una manta

eléctrica, que se autoregula tomando como referencia la propia temperatura del animal.

Una vez que el animal se encontró en un estado de anestesia ligera (estado III-3), que garantiza la ausencia de reflejos que interfieran con la cirugía, se colocó en un marco estereotáxico (instrumentos científicos SR-6 Narishige, Tokio, Japón). Para mejorar la visión de la zona de cirugía, se rasuró tanto el pelo de la cabeza como el del dorso del cuerpo del animal y se aplicó lidocaína al 2% (B.Braun) sobre las zonas corporales donde posteriormente se realizaron las diferentes incisiones. Una vez que hizo efecto la lidocaína, la primera parte de la cirugía que se realizó en el animal fue una laminectomía y para ello, en primer lugar, se identificaron táctilmente las vértebras T9-T10 donde posteriormente se realizó la incisión. En segundo lugar, se realizó una incisión en esa zona identificada y se separó la musculatura que se encontraba alrededor de las vértebras elegidas permitiendo así la extracción del cuerpo vertebral, dejando intacta la duramadre. La segunda parte de la cirugía que se llevó a cabo, en ese mismo animal, fue la apertura de cisterna magna para obtener una mayor estabilidad en los registros ya que tras esta apertura, se produce la salida del líquido cefaloraquídeo produciendo una bajada de la presión intracraneal. La tercera parte de la cirugía que se realizó en el animal fue una craneotomía en el lado derecho del cráneo, sobre el área correspondiente a la corteza somatosensorial primaria de las diferentes zonas corporales necesarias para cada tipo de experimento. En la mayoría de los experimentos, los registros corticales que se llevaron a cabo fueron obtenidos en las coordenadas de la corteza somatosensorial primaria correspondientes a la representación de las garras, delantera y trasera. En algunos experimentos fue además necesario realizar registros en la zona cortical correspondiente a las vibrissas del animal. Para registrar estas diferentes zonas corticales se abrió una ventana en el cráneo, según las siguientes coordenadas: antero-posterior 1 a -4mm y medio-lateral 1 a 5mm (Paxinos y Watson, 2007).

Tras la realización de la craneotomía se situaron los electrodos en las coordenadas estereotáxicas de las zonas corticales detalladas anteriormente, y a partir de ahí se procedió a realizar el protocolo experimental correspondiente.

1) Para los experimentos relacionados con el primer objetivo de esta tesis, se realizó un protocolo inicial que nos permitiera evaluar la actividad espontánea cortical y las respuestas evocadas por estimulación eléctrica periférica. Durante este protocolo, el animal se encontraba en un estado de anestesia ligera (estado III-3; Friedberg et al., 1999, Erchova et al. 2002). Una vez realizado el protocolo inicial se hizo una sección completa de la médula espinal a nivel T9-T10, mediante el uso de un bisturí y la ayuda de un microscopio quirúrgico para asegurarnos que se había realizado una escisión completa de ambos extremos de la médula. Después de la lesión se volvieron a realizar protocolos de estimulación. Entre el protocolo inicial (antes de realizar la lesión medular completa) y los diferentes protocolos después de lesión, los animales no precisaron de ninguna dosis adicional de anestesia debido a la ausencia de reflejos (corneal y de la garra delantera), al igual que no se observaron movimientos de vibras durante el experimento.

2) Para los experimentos relacionados con el segundo objetivo de esta tesis, se realizó un primer protocolo durante el cual el animal se encontraba en un estado de anestesia ligera (estado III-3; Friedberg et al., 1999, Erchova et al. 2002) y con la médula intacta. El protocolo consistió en realizar registros de la actividad espontánea en ambas regiones corticales (representación de la garra delantera y trasera), así como de las respuestas corticales evocadas por la estimulación eléctrica periférica. Tras este primer protocolo, al animal se le suministró una dosis adicional de anestesia ($<1/6$ de la dosis inicial) para que pasara de un estado de anestesia ligera a un estado de anestesia profunda o de onda lenta (estado III-4; Friedberg et al., 1999, Erchova et al. 2002). Una vez que la actividad cortical pasó a un estado de onda lenta, se procedió a la realización del protocolo de estimulación mientras que la médula espinal se mantuvo

intacta. Finalmente, en el mismo animal se realizó una sección completa de la médula espinal, de igual forma que se describió en el anterior modelo experimental. Tras dicha lesión completa, se realizó un nuevo protocolo de estimulación para observar qué ocurría de forma inmediata tanto en la actividad cortical espontánea como en la actividad cortical evocada.

En todos los experimentos de lesión medular, los registros corticales se mantuvieron mientras que se realizaba la lesión, garantizando así que no existía discontinuidad en la señal electrofisiológica por artefacto o movimiento. Una vez realizada la lesión medular completa, comprobábamos mediante la aplicación de pulsos eléctricos de muy alta intensidad (10mA) en la garra desaferentada que la respuesta cortical correspondiente a dicha garra fuera abolida por la lesión. Una vez confirmada la lesión completa, realizábamos registros de actividad espontánea durante un intervalo de tiempo de 10 a 30 minutos y después realizábamos el primer protocolo de estimulación post-lesión.

4.2. Registros electrofisiológicos

Para los experimentos que se llevaron a cabo en esta tesis, fue necesario el uso de 2 técnicas de registros electrofisiológicos: extracelular e intracelular.

4.2.1. Registros extracelulares

Los registros extracelulares se obtuvieron mediante el uso de electrodos de tungsteno de 4-5M Ω a 1000Hz (TM31C40KT y TM31A50KT de WPI, Inc. Sarasota, FL, USA). Los electrodos fueron situados en las capas infragranulares de la corteza somatosensorial primaria. En todos los experimentos, se localizaron al menos 2 electrodos de forma simultánea en 2 zonas corticales principales, según las coordenadas de Chapin y Lin (1984): las áreas corticales somatosensoriales donde se encuentran representadas la garra delantera

(antero-posterior 0.5 a 1mm; medio-lateral 3.5 a 4.5mm) y la garra trasera (antero-posterior: -0.5 a 1mm; medio-lateral: 2 a 2.5mm) (Fig. 5). En algunos experimentos, se localizó también 1 electrodo en una de las siguientes zonas corticales adicionales: el área cortical somatosensorial donde se encuentran representadas las vibrisas (antero-posterior: -3mm; medio-lateral: 5mm, Fig. 5A) o otra coordenada dentro de la zona cortical donde se encuentra representada la garra delantera. Este último electrodo se situó entre los dos electrodos de los registros originales (coordenada antero-posterior: 0mm, Fig. 5B).

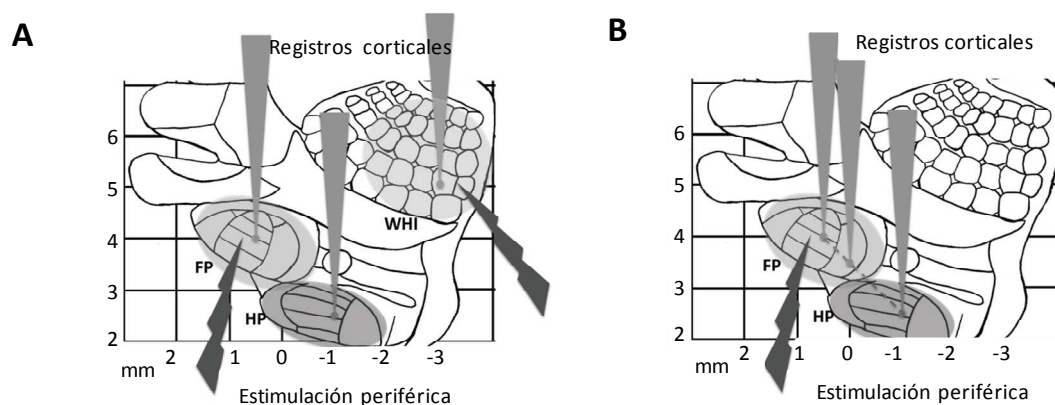


Figura 5: Diagrama que representa tanto las zonas de registros como el protocolo experimental: (A) Mapa esquemático de la corteza somatosensorial primaria, donde los conos grises representan las localizaciones de registro en el área de la garra delantera (FP), el área de la garra trasera (HP) y el área de las vibrisas (WHI), y el rayo representa el estímulo periférico eléctrico en la garra delantera o en las vibrisas. (B) Mapa esquemático de la corteza somatosensorial primaria, donde las localizaciones de registro se encuentran en el área de la garra delantera (FP) y el área de la garra trasera (HP) y el rayo representa el estímulo periférico eléctrico únicamente en la garra delantera.

En el primer grupo experimental, además de utilizar las coordenadas estereotáxicas que sirvieron como primera aproximación, la localización exacta antero-posterior y medio-lateral de los electrodos fue obtenida mediante distintas penetraciones (hasta 5, normalmente 3 penetraciones por electrodo) hasta optimizar las respuestas evocadas (máxima amplitud y mínima latencia) ante los estímulos periféricos de las zonas corporales correspondientes. Para

ajustar la profundidad en los diferentes experimentos, primero se identificó la capa IV a través de la estimulación táctil de la zona corporal que se pretendía identificar en esa zona cortical de registro. Las respuestas táctiles confirmaban electrofisiológicamente que nos encontrábamos en la zona cortical correcta y de ahí continuamos bajando el electrodo hasta alcanzar la profundidad necesaria de las capas infragranulares (profundidad: 1.1 a 1.6 mm). Una vez situados los electrodos en dichas capas, se mantuvieron en esa localización durante todo el experimento. Se eligió registrar en las capas infragranulares debido a los siguientes motivos: 1) son las capas corticales donde se produce la mayor convergencia de entradas excitatorias e inhibitorias, tanto locales como de larga distancia (Agmon y Connors, 1992, Thomson y Lamy, 2007,); 2) constituyen el principal origen de las salidas corticales (Ghosh et al., 2011, Thomson y Lamy, 2007) y; 3) son las capas donde se originan la mayoría de los estados activados (Castro-Alamancos, 2000; Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Castro-Alamancos y Rigas, 2002; Sakata y Harris, 2009). Por todo lo anterior, las capas infragranulares son particularmente interesantes para investigar el cambio de la red cortical tras una lesión medular. No obstante, dado que los estados activados rápidamente se sincronizan en todas las capas corticales, los cambios observados en las capas infragranulares probablemente se reflejen también en las capas supragranulares (Chauvette et al. Cerebral cortex, 2010; Compte et al., 2003).

Los registros extracelulares fueron pre-amplificados en modo AC con un filtro entre 1Hz y 3KHz en los experimentos del primer objetivo, o en modo DC con un filtro de <3KHz en los experimentos del segundo objetivo, utilizando un sistema de registro modular (Neurolog; Digitimer Ltd.). Las señales analógicas fueron convertidas a digitales con una frecuencia de muestreo de 20kHz y una resolución de 16 bit (CED power 1401, Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK). Las señales fueron almacenadas en un disco duro de un PC para

el análisis posterior, que se hizo con el software Spike2 (v6 Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK).

4.2.2. Registros intracelulares

En un grupo de experimentos (n=5 animales) los registros intracelulares fueron realizados en la corteza de la garra trasera a nivel infragranular, simultáneamente a los registros extracelulares en la corteza de la garra delantera, antes y después de una lesión medular completa y bajo un estado de anestesia profunda. Para mejorar la estabilidad de los registros intracelulares, la corteza se cubrió con agar al 4% (Sigma-Aldrich). Este proceso disminuye la pulsación cortical y mantiene en buenas condiciones la zona cortical a lo largo del tiempo durante todo el experimento. Los registros intracelulares se obtuvieron con electrodos específicos (micropipetas) usando un amplificador intracelular (Axoclamp2B, Molecular Devices). Las micropipetas se hicieron a partir de capilares de vidrio con fibras intraluminal (borosilicate, o.d. 1.5mm, i.d. 0.86mm; Modelo G150F-4; Harvard Apparatus) que se estiraron con un estirador de pipetas horizontal Brown-Flaming (Model P-97; Sutter Inst.) y se llenaron de acetato potásico 2.5M (Sigma-Aldrich). Dichas micropipetas tenían una resistencia en un rango entre 60 y 100M Ω .

Una vez que las primeras células fueron registradas bajo una actividad cortical en onda lenta, la micropipeta se extrajo dejando una marca de la zona de registro en el agar, se llevó a cabo la lesión medular y todas las micropipetas que se bajaron a continuación se localizaron en la misma zona identificada anteriormente. Se aplicaron pulsos de corrientes positivos y negativos con valores de 0.3, 0.6 y 0.9 nA de intensidad y duración con un rango entre 100 y 800ms. Ello permitió poder medir la resistencia de entrada celular y clasificar las neuronas que se registraron según el tipo de disparo. Los registros intracelulares fueron incluidos en el análisis cuando las neuronas cumplían las siguientes condiciones: 1) los registros intracelulares se mantenían estables

durante un intervalo mínimo de 5 min (la mayoría de las neuronas fueron registradas durante más de 30 min); 2) las neuronas oscilaban en un estado de onda lenta, que se caracterizaba por una distribución bimodal en el potencial de membrana (oscilaciones entre “down states” y “up states”) y su potencial de membrana en reposo neuronal se encontraba por debajo de los -60mV; 3) las neuronas presentaban potenciales de acción con una amplitud mayor de 50mV. También obtuvimos registros yuxtacelulares en las capas infragranulares, utilizando las mismas micropipetas que los registros intracelulares.

4.3. Estimulación periférica

Se estimularon diferentes zonas corporales del animal según las diferentes zonas de registro localizadas. La estimulación periférica se llevó a cabo a través de pulsos eléctricos aplicados mediante electrodos bipolares de aguja localizados a ambos lados de la zona de estimulación. Para la estimulación de las garras, se colocaron los electrodos de forma subcutánea a ambos lados de la muñeca del animal de manera que cada polo se situó en cada lado de la garra (delantera o trasera). Para la estimulación de las vibrisas, se colocaron los electrodos de forma subcutánea en la zona superior de la primera fila y en la zona inferior de la última fila de vibrisas del animal.

Los esquemas de estimulación son los siguientes:

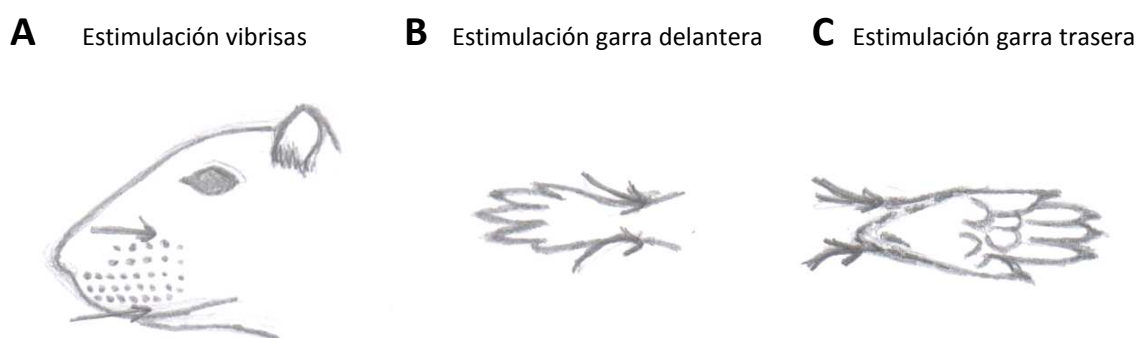


Figura 6: Esquema de estimulación eléctrica periférica de forma subcutánea: (A) Estimulación de las vibrisas de la rata. Cada polo de estimulación viene representado por las flechas; un polo

se sitúa encima de la primera fila de vibrisas y el segundo polo se dispone debajo de la última fila de vibrisas del animal. (B) Estimulación de la garra delantera de la rata. Cada polo de estimulación viene representado por las flechas: un polo a cada lado de la muñeca del animal. (C) Estimulación de la garra trasera de la rata. Cada polo de estimulación viene representado por las flechas: un polo a cada lado del tobillo del animal.

El protocolo de estimulación consistió en un total de 100 estímulos monofásicos de 1ms de duración cada uno, aplicados con una frecuencia de 0.5Hz. Los estímulos fueron aplicados con dos intensidades diferentes (0.5mA y 5mA). Con los estímulos de baja intensidad (0.5mA) buscábamos activar sólo una fracción de las fibras, principalmente las primarias de bajo umbral (tipo A α y β) que van a través de las columnas dorsales al tronco del encéfalo, activando la vía lemniscal (Lilja et al., 2006; Yague et al., 2011). Con los estímulos de alta intensidad (5mA) pretendíamos activar el máximo número de fibras, incluyendo las primarias de alto umbral (Tipo A δ y C) que hacen sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal, a su vez activando el tracto espinotalámico (Lilja et al., 2006; Yague et al., 2011).

El esquema básico sobre la estimulación que se le aplica al animal fue el siguiente:

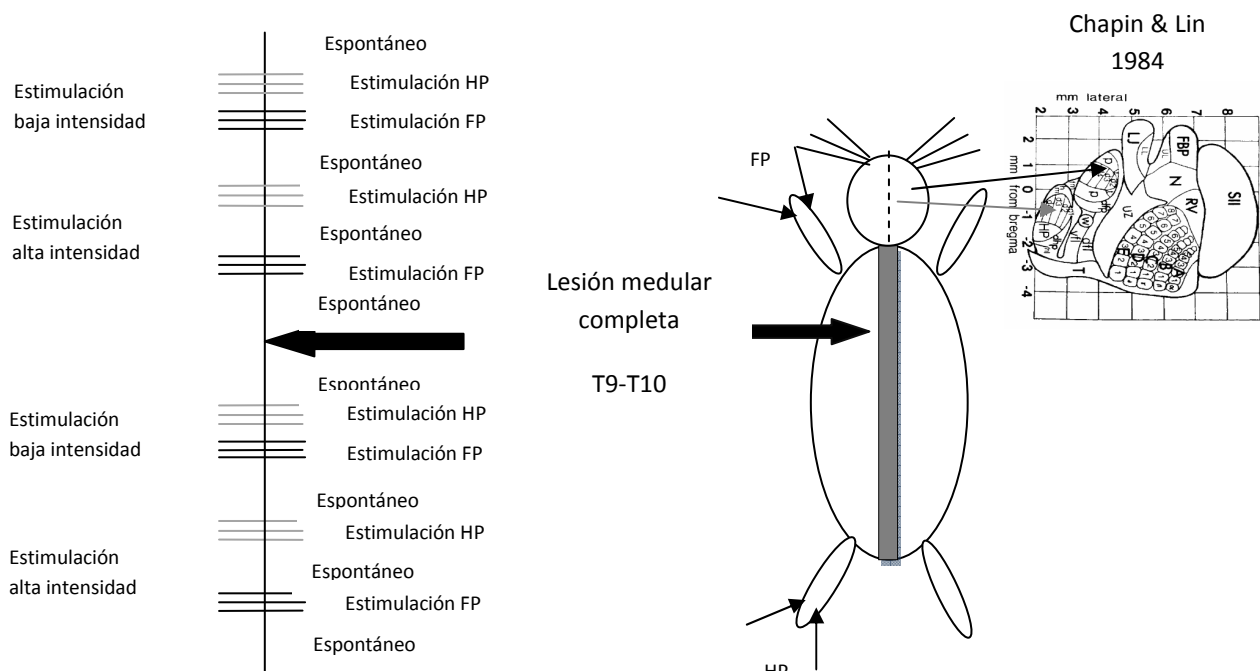


Figura 7: Esquema del protocolo de estimulación. En la parte izquierda de la figura hay un esquema donde se muestra el protocolo de estimulación básico que se siguió en todos los experimentos realizados durante esta tesis. Se realizaron registros de actividad espontánea y estimulaciones eléctricas a dos intensidades en las diferentes zonas corporales (se señalan las zonas corporales en el esquema de la rata que está a la derecha de la figura). En el esquema de la rata se muestra la zona donde se realiza la lesión medular aproximadamente (flecha negra gruesa) como las zonas corticales de los registro principales (estas zonas corticales aparecen contralateral a la zona de estimulación).

En el caso de los experimentos donde se realizaron registros intracelulares, el tipo de estimulación fue el mismo (cada estímulo tuvo una duración de 1ms y una frecuencia de aparición de 0.5Hz), pero el número de estímulos de alta intensidad a los que se les sometieron al animal fue menor (mínimo 20 estímulos). Estos estímulos periféricos de alta intensidad a la garra delantera nos permitieron medir las entradas sinápticas en la corteza desaferentada (garra trasera). En situación control se estimuló tanto la garra delantera como la trasera, mientras que después de la lesión medular sólo se estimuló la garra delantera, obteniendo las respuestas corticales asociadas al estímulo de la zona intacta y desaferentada.

4.4. Experimentos control

Se realizaron experimentos control que se correspondieron con las necesidades experimentales de cada objetivo abordado:

- Para el primer objetivo de esta tesis, se necesitaron dos experimentos que nos permitieran controlar que los resultados obtenidos en el experimento principal fueran efectivamente debidos a la desaferentación medular:

4.4.1. Experimento de bloqueos farmacológicos

Este experimento se llevó a cabo con un grupo de 8 animales, en los que se realizaron registros extracelulares de la corteza somatosensorial primaria de

la garra delantera y trasera en un estado de anestesia ligera (estado III-3; Friedberg et al., 1999, Erchova et al. 2002). Tras realizar este protocolo inicial, se procedió al bloqueo farmacológico de la conducción nerviosa de la médula espinal, aplicando bloqueantes de canales de sodio dependientes de voltaje (TTX o lidocaína) a nivel torácico (T9-T10). Se aplicaron unas gotas de TTX (50 μ M) o lidocaína (2% en salino) (una vez retirada la duramadre y piamadre) directamente sobre la médula espinal y se colocó seguidamente una pieza de algodón sobre la superficie de esa zona medular. El bloqueo de la conducción axonal fue verificado por la ausencia de respuestas fisiológicas a estímulos eléctricos en la garra trasera a muy alta intensidad (10mA) (Fig. 8, bloqueo). Tan pronto como fue evidente la supresión de la conducción axonal, se procedió a realizar un protocolo de estimulación como previamente se ha descrito en los experimentos de lesión real. Posteriormente se llevó a cabo el lavado del bloqueante con solución salina hasta que se consiguió revertir el bloqueo, lo cual fue evidente al observar la recuperación de las respuestas evocadas ante los estímulos aplicados en la garra trasera (Fig. 8, recuperación). Con este experimento se pretendió simular los efectos provocados por la lesión medular en términos de desaferentación sensorial pero sin causar el daño traumático que supone la lesión medular completa.

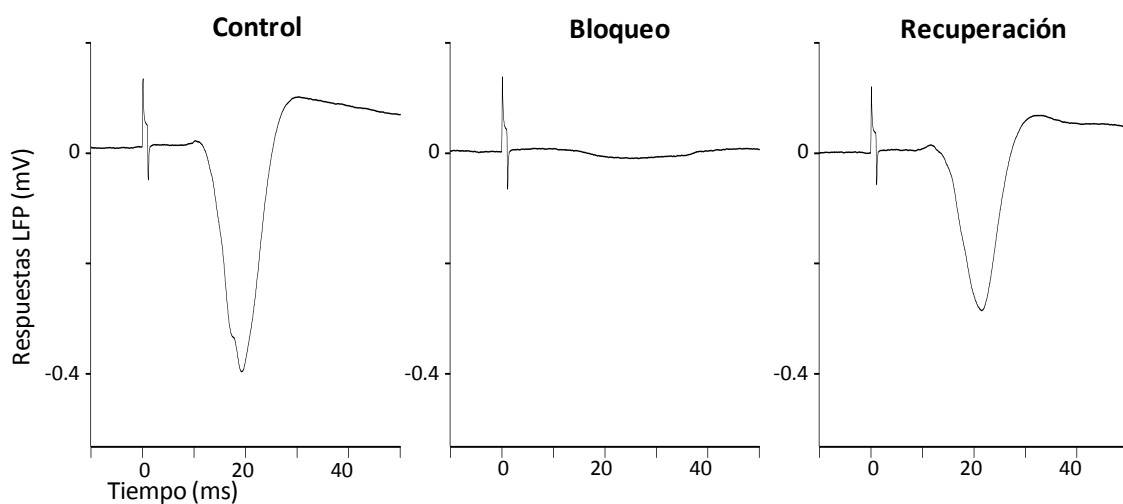


Figura 8: Bloqueo farmacológico de la médula espinal. Respuestas evocadas en la corteza de la garra trasera por estímulos de alta intensidad aplicados en la garra trasera a lo largo del experimento de bloqueo farmacológico. Experimento representativo, donde se muestra la respuesta cortical de la garra trasera en el protocolo inicial, la respuesta bloqueada y la respuesta recuperada tras el lavado del bloqueante.

4.4.2. Experimento control durante anestesia ligera

Este experimento se llevó a cabo con un grupo de 9 animales, donde se realizaron registros extracelulares de la corteza somatosensorial primaria de la garra delantera y trasera en un estado de anestesia ligera (estado III-3; Friedberg et al., 1999, Erchova et al. 2002). A lo largo de todo el experimento, se mantuvo el animal con la médula intacta tras la laminectomía. Se realizaron los mismos protocolos de estimulación que en los experimentos con animales lesionados y con bloqueo farmacológico. Este control nos permitió verificar que la laminectomía sin lesión no tuviera efectos comparables a la lesión o al bloqueo medular.

4.4.3. Experimento control durante anestesia profunda

Este experimento se llevó a cabo con un grupo de 8 animales, donde se realizaron registros extracelulares de la corteza somatosensorial primaria de la garra delantera y trasera en un estado de anestesia profunda (estado III-4; Friedberg et al., 1999, Erchova et al. 2002), que se caracteriza por la actividad en onda lenta. A lo largo de todo el experimento, se mantuvo el animal con la médula intacta tras la laminectomía. Se realizó el mismo protocolo de estimulación que en los experimentos con animales lesionados y con bloqueo farmacológico. Este control permitió determinar si el estado continuado de onda lenta interfirió con los resultados de lesión medular.

4.5. Análisis de datos

4.5.1. Respuestas corticales

En los registros extracelulares, las respuestas corticales se midieron de dos formas diferentes: potencial de campo local y actividad multi-unitaria. Las respuestas de potencial de campo local (local field potential, LFP, Fig. 9A) fueron obtenidas promediando las señales registradas a lo largo de 100 estímulos. La amplitud de la respuesta de los potenciales de campo local fue evaluada como el valor absoluto del pico negativo en el promedio de la respuesta, y la latencia de estas respuestas fue considerada como el intervalo de tiempo desde el estímulo hasta el pico de esa respuesta (Fig. 9B).

La actividad multi-unitaria fue obtenida realizando un filtrado de alta frecuencia (300-3000Hz) (Fig. 8) y fue analizada de dos formas diferentes. 1) Por un lado se pudo obtener la cuantificación de las espigas que excedían del ruido base en al menos 5 veces el valor de su desviación estándar (Fig. 9A, donde se ve un umbral en el registro de la actividad multi-unitaria). Promediando las espigas producidas por cada estímulo, se construyeron histogramas de tiempo peri-estímulos (peri stimulus time histograms, PSTH, Fig. 9C). La magnitud de la respuesta multi-unitaria fue evaluada como el número medio de espigas por estímulos producidos en los primeros 30 ms después del estímulo. 2) Por otro lado la actividad multiunitaria filtrada fue rectificada (rMUA, Fig. 9A, el último registro de la figura 9A) y promediada con respecto a los estímulos aplicados. La respuesta multi-unitaria fue definida como la amplitud de la señal rMUA promediada y fue cuantificada como el área de los primeros 50ms desde el estímulo, después de sustraer la actividad de base.

Otro análisis que se llevó a cabo fue la selección de estímulos, que fueron visualmente clasificados si sucedieron durante un estado cortical silente (down state, DOWN) o un estado activado (up state, UP), basándonos tanto en el LFP como en la actividad de la señal de rMUA de cada uno de los estímulos (Fig. 9A),

según los siguientes criterios: (1) el estímulo sucedió en un estado silente si ambos, LFP y MUA, no mostraban actividad antes del estímulo en un intervalo de tiempo inferior a 100ms; (2) el estímulo sucedió en un estado activado si ambos, LFP y MUA, mostraban actividad inmediatamente antes del estímulo; (3) el estímulo no fue clasificado si no cumplió ninguno de los criterios anteriores.

La actividad multi-unitaria rectificada se utilizó también para la cuantificación de la inhibición intracortical. Esta inhibición aparece inmediatamente después de la respuesta excitadora de corta latencia y se definió como el intervalo de tiempo entre el final de la respuesta excitadora y el inicio de la activación de larga latencia (Fig. 9D). Para obtener esta medida sólo se utilizaron los estímulos que sucedieron en estados silentes.

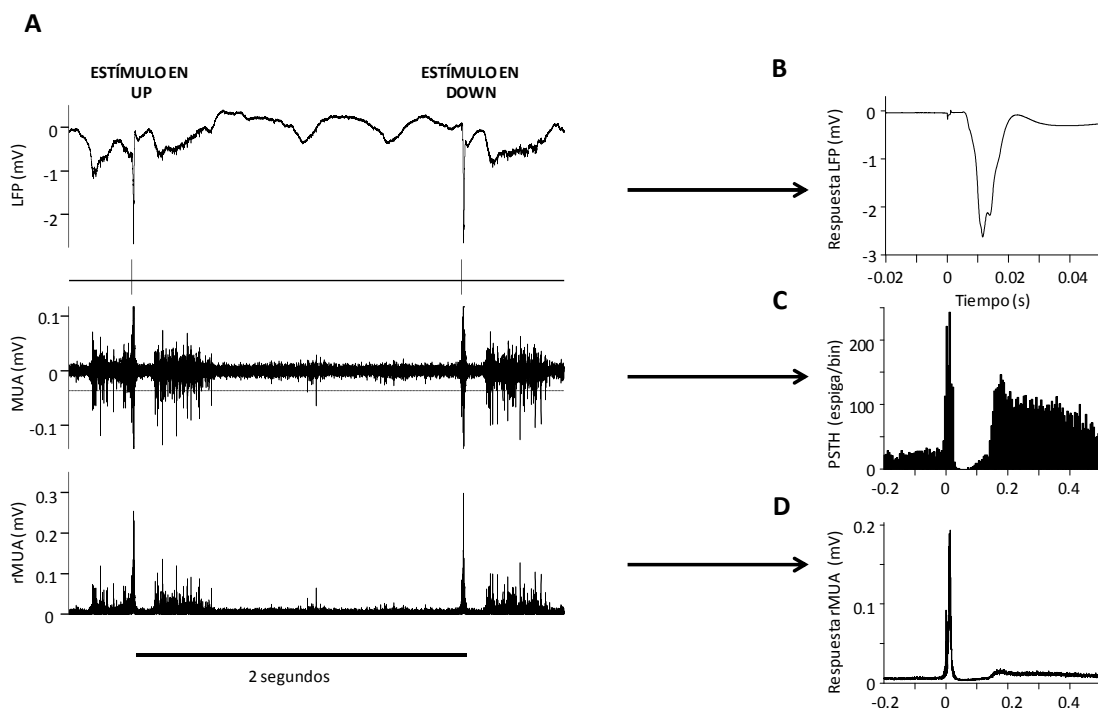


Figura 9: Análisis de las respuestas evocadas. (A) Se muestra un registro en crudo - potencial de campo local (LFP) - donde se observa la respuesta cortical según el estado cortical existente: estado activado (o UP) y estado silente (o DOWN). A partir del LFP se filtra la señal obteniendo la actividad cortical multi-unitaria (MUA), a través de la cual podemos seleccionar las espigas que exceden de un umbral (5 veces la desviación estándar de ese registro). A partir del MUA obtenemos el rectificado de esa señal (rMUA). (B) Respuesta del potencial de campo local (respuesta LFP), que se obtiene promediando las respuestas corticales evocadas por los

100 estímulos eléctricos periféricos. (C) Histograma de tiempo peri-estímulo (PSTH), que se obtiene promediando las respuestas de la actividad multi-unitaria. (D) Respuesta de la señal de la actividad multi-unitaria rectificada (respuesta rMUA), que se obtiene promediando las respuestas de la actividad multi-unitaria rectificada.

En los registros intracelulares, las respuestas corticales se midieron de dos formas diferentes: respuesta supraumbral y subumbral. Las respuestas supraumbral en los registros intracelulares (y en los yuxtacelulares) son los potenciales de acción de las neuronas evocados por el estímulo periférico. Para la cuantificación de estas respuestas se realizaron PSTHs donde la magnitud de la respuesta es el promedio de espigas por estímulo, en los primeros 50ms después del estímulo. El valor de la magnitud de la respuesta se transformó logarítmicamente ($y = \text{Log} [x+0.01]$) para la realización de la estadística. La respuesta subumbral en los registros intracelulares son los potenciales sinápticos de las neuronas evocados por un estímulo periférico. Para la cuantificación de estas respuestas, se aplicó un filtro mediano a la señal original para eliminar los potenciales de acción. La amplitud de las respuestas evocadas se obtuvo del promedio de los potenciales sinápticos evocados por los estímulos eléctricos somatosensoriales, midiendo el valor del pico desde la línea base de las respuestas promediadas, en 40 ms después del inicio del estímulo.

La pendiente de la respuesta del potencial sináptico se obtuvo con una aproximación lineal de la amplitud total de dicha respuesta, quitando el 10% (el 5% desde la línea de base y el 5% desde el pico máximo). Con el uso de este método de medida fue posible descartar el inicio y la parte final del pico máximo de la entrada sináptica, minimizando posibles errores en las medidas de las pendientes.

4.5.2. Actividad espontánea

Para este trabajo fue necesario monitorizar el estado de la actividad cortical, tanto en el primer objetivo como en el segundo, a lo largo de todo el experimento, para poder separar los fenómenos dependientes del estado de los que pudieron ser independientes de él. Fue por lo tanto necesario utilizar diferentes medidas de la actividad espontánea, que se obtuvieron de registros de una duración mínima de 150 segundos, realizados entre las estimulaciones de baja y alta intensidad.

Una primera medida de la actividad espontánea es el voltaje medio de la señal de rMUA, el cual se obtuvo de la señal original filtrada y rectificada. Para validar la señal del rMUA como una buena medida del estado cortical, se utilizaron registros intracelulares y extracelulares simultáneos, de la corteza de garra trasera y delantera respectivamente, de forma similar al estudio que realizaron Hasenstaub et al. (2007). La señal del rMUA está bien correlacionada con el potencial de membrana de las neuronas registradas intracelularmente (Fig. 10).

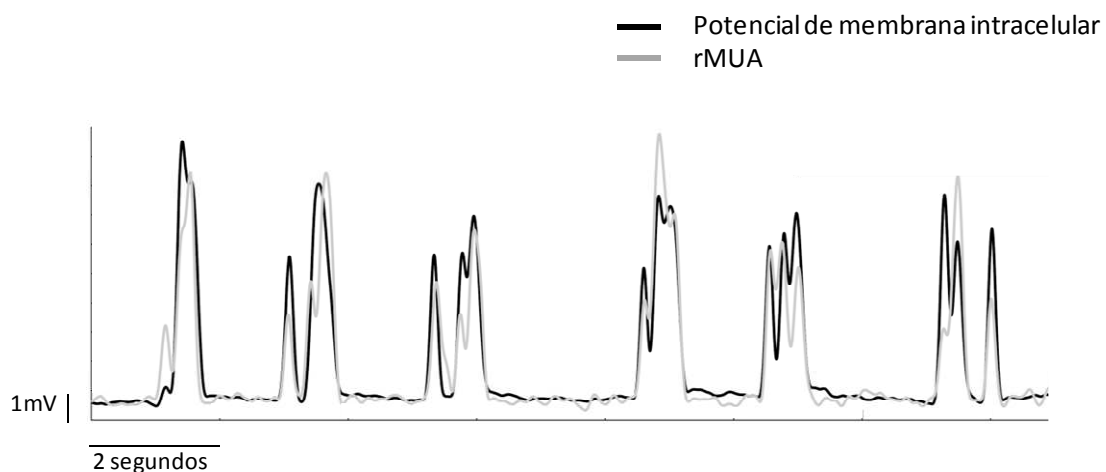


Figura 10: Correlación entre rMUA y potencial de membrana intracelular. En este registro se representan tanto la señal rMUA (línea gris) como el potencial de membrana intracelular (línea negra) mostrando un alto grado de correlación.

Una segunda medida de la actividad espontánea es la frecuencia principal del espectro de la señal de rMUA (Fig. 11), que representa frecuencia de oscilación de estados activados y silentes. La consistencia neurofisiológica de esta medida fue visualmente verificada en todos los experimentos y los registros en los que la señal de rMUA no alcanzaba un voltaje frente al ruido suficiente para estimar correctamente el espectro, fueron excluidos de este análisis.

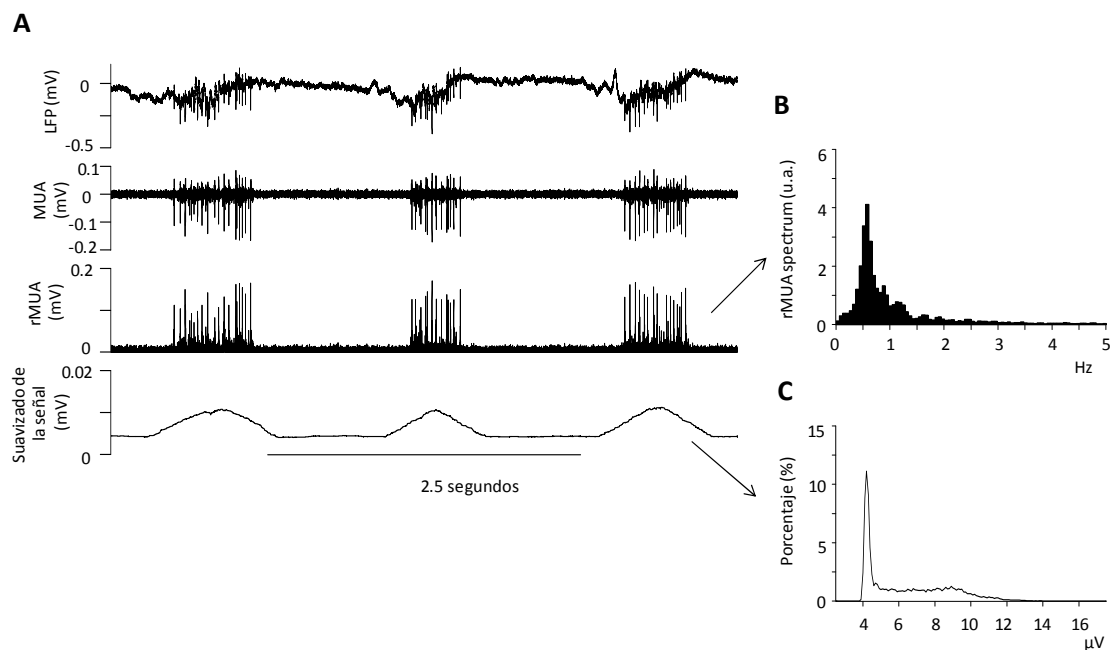


Figura 11: Análisis de la actividad espontánea. (A) Registro en crudo de la actividad espontánea cortical (LFP). A partir del LFP se realiza un filtrado de la señal obteniendo la actividad cortical multi-unitaria (MUA) que se rectifica (rMUA), y se suaviza. (B) Espectro de la señal rMUA. Este análisis nos permite cuantificar la frecuencia principal en la que oscila la actividad cortical espontánea. (C) Distribución bimodal de la actividad espontánea. Este análisis nos permite cuantificar los voltajes rMUA entre lo que oscila la actividad espontánea.

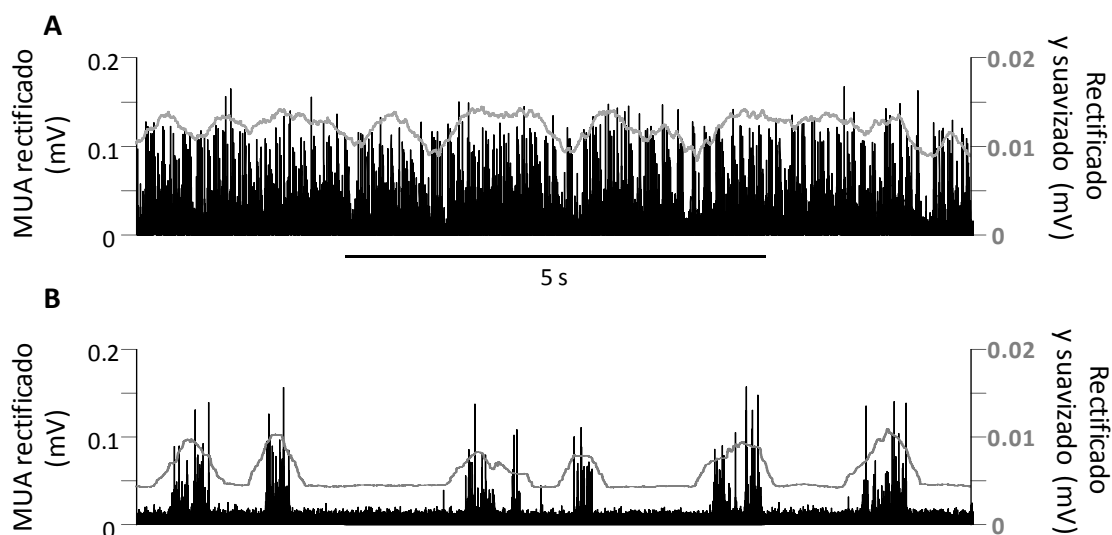


Figura 12: rMUA y suavizado de la señal. (A) rMUA de la señal en un registro en estado activado. El eje y de la izquierda es el voltaje de la señal rMUA, el eje y de la derecha muestra el suavizado de la señal rMUA, y el eje x es el tiempo. (B) rMUA de la señal en un registro en estado de onda lenta. El eje y de la izquierda es el voltaje de la señal rMUA, el eje y de la derecha se corresponde con el suavizado de la señal rMUA, y el eje x es de tiempo. Cuando la actividad cortical es alta o está en un estado activado el voltaje medio de la señal rMUA es elevado, mientras que si la actividad está en onda lenta el voltaje medio es menor.

Una tercera medida de la actividad espontánea es la moda de la distribución del voltaje de la señal de rMUA (la media de dicha distribución corresponde al voltaje medio de rMUA descrito anteriormente). Durante la actividad en onda lenta, el voltaje de la señal de rMUA muestra una típica distribución bimodal (Fig.11C) similar a la distribución que se obtiene con el potencial de membrana de las neuronas registradas intracelularmente, como se mostró en la figura 10. La moda es el pico más alto de la distribución, que en nuestros experimentos en onda lenta se corresponde con el nivel de actividad durante un estado silente (DOWN), lo que nos proporciona una medida sensible para detectar el estado cortical en una condición de estabilidad temporal ya que el DOWN no debe variar si el estado se mantiene.

En cada experimento, obtuvimos el valor medio del voltaje de la señal rMUA en cada una de las condiciones experimentales en el mismo animal, lo que nos permitió relacionar, el voltaje promedio con el análisis de las frecuencias principales del rMUA. Los estados más activos (análisis de frecuencia en estado delta o de anestesia ligera) están relacionados con voltajes rMUA mayores (Fig. 12A) mientras que los estados en onda lenta están relacionados con voltajes menores (Fig. 11A y 12B).

4.5.3. Correlación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas

Para estudiar la relación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas, cuantificamos la actividad de la señal de rMUA en una ventana de tiempo antes de cada estímulo y medimos la amplitud de la respuesta del LFP después de cada estímulo, con el fin de obtener una correlación entre ambas medidas. En el trabajo que realizamos para el primer objetivo, se promedió sobre bloques de 10 estímulos para obtener 10 puntos por animal, y finalmente se promedió entre animales. En el trabajo que llevamos a cabo en relación con el segundo objetivo realizamos esta correlación entre actividad espontánea y respuestas evocadas sin promediar (Fig. 13), es decir, estímulo a estímulo.

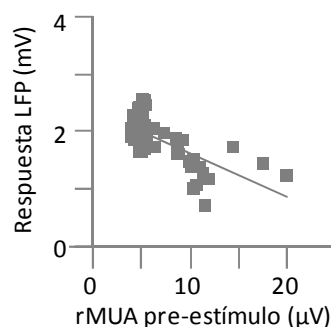


Figura 13: Correlación entre la actividad espontánea y las respuestas evocadas. El eje representa la actividad rMUA que precede cada estímulo, y el eje y representa la amplitud de las correspondientes respuestas evocadas del LFP.

4.6. Análisis estadístico

4.6.1. Análisis estadísticos del primer objetivo

Respuestas evocadas: Los cambios en las respuestas corticales fueron evaluados con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con PRE-POSTLESIÓN como primer factor con 2 niveles (antes y después de la sección medular) y ESTÍMULO como segundo factor con 2 niveles (baja y alta intensidad).

Actividad espontánea: Para el estudio de los cambios en la actividad cortical espontánea se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, fijando el TIEMPO como primer factor con 2 niveles (antes y después de la sección medular) y ELECTRODO como segundo factor con 2 niveles de medidas independientes (corteza de garra delantera y trasera).

El test de Tukey de diferencias significativas se utilizó para todas las comparaciones post-hoc.

Las correlaciones entre la actividad espontánea y las respuestas evocadas se cuantificaron con el coeficiente de correlación de Pearson.

4.6.2. Análisis estadísticos del segundo objetivo

Actividad espontánea: Los cambios en la actividad espontánea se evaluaron con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, tanto para la media como la moda de la señal de rMUA, con TIEMPO como primer factor con 3 niveles (anestesia ligera, anestesia profunda y lesión medular) y ELECTRODO como segundo factor con 2 niveles (corteza de garra delantera y trasera). El mismo ANOVA fue usado para el pico de la frecuencia principal del espectro de la señal de rMUA pero en este caso el factor TIEMPO tiene 2 niveles (anestesia profunda y lesión medular) debido a la ambigüedad de las medidas cuando el animal se encuentra en un estado ligero de anestesia.

Respuestas evocadas: Utilizamos un ANOVA de dos vías de medidas repetidas en el que el primer factor era TIEMPO con 3 niveles (anestesia ligera, anestesia

profunda y lesión medular) y ESTÍMULO como segundo factor con 2 niveles (baja y alta intensidad). Los cambios en la latencia de la respuesta a estímulos de la garra delantera a alta intensidad fue evaluado con un ANOVA de una vía de medidas repetidas sobre el factor TIEMPO (uno de los 12 experimentos tenían una inusual larga latencia en la respuesta y fue excluido del análisis). El mismo ANOVA de una vía fue usado para evaluar los cambios en la duración de la inhibición existente después de la respuesta a estímulos de la garra delantera a alta intensidad. El análisis de los cambios en la respuesta cortical separando los estímulos que sucedían en un estado cortical silente o activado fue evaluado con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con TIEMPO como primer factor con 2 niveles (antes y después de la lesión) y ESTADO como segundo factor con 2 niveles (estado activado (UP) y silente (DOWN)), usando sólo estímulos de alta intensidad.

En los experimentos con el tercer electrodo, los cambios en las respuestas de LFP en la corteza de la garra delantera a estímulos de la garra delantera a alta intensidad fueron evaluados también con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con TIEMPO como primer factor con dos niveles (anestesia profunda y lesión medular completa) y ELECTRODO como segundo factor con dos niveles (corteza de garra delantera 1 y corteza de la garra delantera 2).

En los experimentos con tercer electrodo en la corteza de las vibrisas, los cambios en las respuestas de LFP en la corteza de las vibrisas evocadas por estímulos de las vibrisas a alta intensidad fueron evaluados con un ANOVA mixto, con TIEMPO como primer factor con dos niveles (anestesia profunda y lesión medular completa) y ESTÍMULO/ELECTRODO como segundo factor con dos niveles (garra delantera y vibrisas).

En los experimentos control con animales intactos, utilizamos un ANOVA de dos vías de medidas repetidas en el que el primer factor era TIEMPO con 2 niveles (protocolo inicial y después de la supuesta lesión, sin daño físico de la

médula espinal) y ESTÍMULO como segundo factor con 2 niveles (baja y alta intensidad).

Cambios en las respuestas de la señal de rMUA en la corteza de la garra trasera al estímulo de alta intensidad de la garra delantera fueron analizados con un ANOVA de una vía de medidas repetidas sobre el factor TIEMPO.

El test de Tukey de diferencias significativas se utilizó para todas las comparaciones post-hoc.

Comparaciones adicionales entre medias, porcentajes y correlaciones fueron realizadas con t-tests, test de dos proporciones y coeficiente de correlación de Pearson.

Todos los resultados fueron considerados significativos con $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

Esta tesis tiene como objetivo principal el estudio de los cambios fisiológicos en la corteza somatosensorial primaria inmediatamente después de una lesión medular completa, a nivel de T9-T10, en ratas anestesiadas. Para llevar a cabo este estudio se dividió el objetivo principal en dos objetivos específicos:

1) El primer objetivo específico se basó en el estudio de la actividad espontánea y evocada por estímulos eléctricos de la corteza somatosensorial primaria antes y después de una lesión medular completa a nivel torácico. Para alcanzar este objetivo se realizaron 3 experimentos diferentes:

- El experimento principal, consistió en realizar registros en la corteza somatosensorial primaria sobre la representación de la garra delantera (Forepaw, FP) y trasera (Hindpaw, HP) partiendo de un estado de anestesia III-3 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al., 2002) y manteniendo la médula espinal intacta en el protocolo inicial. Se llevó a cabo el estudio de la actividad espontánea y evocada por estimulación periférica antes y después de lesión medular en la corteza somatosensorial primaria.

- El experimento de bloqueo farmacológico, consistió en realizar registros en las mismas localizaciones corticales que en el experimento principal y se siguió el mismo protocolo experimental, pero se llevó a cabo una desaferentación sensorial de la médula espinal sin daño físico.

- El experimento control durante anestesia ligera, consistió en realizar registros en las mismas localizaciones corticales que en el experimento principal y se siguió el mismo protocolo experimental, pero se mantuvo la médula intacta a lo largo de todo el experimento, sin desaferentación alguna.

2) Tras obtener los resultados del primer objetivo, observamos que la lesión medular producía un cambio en el estado de la actividad cortical que provocaba modulaciones en las respuestas corticales por estímulos periféricos.

A partir de este primer resultado propusimos un segundo objetivo en el que se estudiaron los cambios corticales independientes del estado después de una lesión medular completa. Para alcanzar este objetivo realizamos una serie de experimentos en los que conseguimos controlar el estado cortical, mediante dosis suplementarias de anestesia.

- El experimento principal de este segundo objetivo, consistió en realizar registros en la corteza somatosensorial primaria sobre la representación de la garra delantera (Forepaw, FP) y trasera (Hindpaw, HP) partiendo de un estado de anestesia III-3 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al., 2002) con la médula espinal intacta. Se llevó a cabo el protocolo experimental en esta condición inicial. A continuación, se añadió una dosis suplementaria de anestesia al animal para obtener un estado de anestesia III-4 (Friedberg et al., 1999; Erchova et al., 2002), y se realizó otro protocolo de estimulación. Finalmente se hizo la lesión medular y se realizó otro protocolo de estimulación. Este experimento nos permitió estudiar las respuestas corticales evocadas en diferentes condiciones experimentales (animal intacto durante anestesia ligera, profunda y después de lesión medular).

- El experimento control durante anestesia profunda, consistió en realizar registros en las mismas localizaciones corticales que en el experimento principal pero en este caso el animal se encontraba en estado cortical en onda lenta o de anestesia profunda desde el protocolo inicial (estado III-4; Friedberg et al., 1999, Erchova et al., 2002). Durante todo el experimento se mantuvo la médula intacta.

- El experimento adicional, consistió en realizar registros en tres zonas corticales, en las mismas localizaciones principales (HP y FP) y en la zona correspondiente a las vibrisas o en otra zona cortical de la garra delantera. Estos experimentos nos permitieron acotar las áreas corticales afectadas por la lesión medular.

- Otro experimento adicional, consistió en realizar registros en las mismas localizaciones corticales que en el experimento principal pero en este caso, el registro de la zona cortical representación de la garra trasera fue un intracelular (o yuxtacelular). Este experimento nos permitió conocer los cambios a nivel celular de la corteza desaferentada.

A continuación se exponen los resultados obtenidos según el objetivo al que pertenezcan.

5.1. Cambios corticales dependiente del estado

5.1.1. Cambios en las respuestas corticales

En primer lugar estudiamos los cambios inmediatos en las respuestas corticales del potencial de campo local (Local Field Potential, LFP) evocados por estímulos eléctricos, aplicados en la garra delantera y trasera, antes y después de una lesión medular completa a nivel torácico (Fig. 14 A, B). Las respuestas de LFP son el equivalente intracraneal de los potenciales evocados somatosensoriales (SEP) usados en estudios con humanos.

En animales intactos (n=14), el promedio de las respuestas de LFP evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulos eléctricos de dicha garra presentaron una amplitud mayor que el promedio de las respuestas de LFP evocadas en la corteza de la garra trasera por estímulos de dicha garra (Tabla 1, Fig. 14B). Este resultado es consistente con trabajos previos (Moxon et al., 2008). Inmediatamente después de la sección medular se comprobó que la estimulación de la garra trasera no producía respuestas corticales, confirmando que se había realizado una lesión medular completa. A partir de este momento consideramos que la corteza de la garra trasera quedaba desaferentada. Después de la lesión, las respuestas evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulos de dicha garra (situada por encima del nivel de lesión) incrementaron de forma significativa (Tabla 1, Fig. 14A, B; ANOVA de dos vías,

factor antes y después de lesión medular: $p=0.0001$). Este incremento en la amplitud de la respuesta fue observado únicamente en las respuestas evocadas por estímulos de alta intensidad (5mA) (interacción: $p=0.0004$; Tukey: $p=0.0002$), pero no ocurrió de igual forma en las respuestas evocadas por estímulos de baja intensidad (0.5mA) (Tukey: $p=0.99$).

La señal electrofisiológica original se sometió a un filtrado para eliminar las bajas frecuencias y obtener la actividad multi-unitaria, que se utilizó para realizar los histogramas de tiempo peri-estímulos (PSTHs) y cuantificar las respuestas multi-unitarias. Los resultados que obtuvimos fueron que, al igual que las respuestas de campo, la actividad multi-unitaria de la corteza intacta mostró un incremento en la magnitud de las respuestas tras la lesión medular (ANOVA de dos vías, factor antes y después de la lesión medular: $p=0.0109$, Fig. 14C). Nuevamente, el incremento fue significativo únicamente en las respuestas evocadas por estímulo de alta intensidad (desde 5.2 ± 2.7 a 7.0 ± 2.5 espigas/estímulos; interacción: $p=0.000393$; Tukey: $p=0.0002$), pero no así en las respuestas evocadas por estímulos de baja intensidad (1.2 ± 1.0 y 1.4 ± 1.4 espigas/estímulos; Tukey: $p=0.73$).

No esperábamos este incremento en la magnitud de la respuesta en la corteza intacta. De hecho la idea original del trabajo era el estudio de la zona cortical desaferentada en respuesta a la estimulación de regiones corporales por encima de nivel de lesión (garra delantera). Por lo tanto, nos centramos en entender este primer resultado, aunque inesperado, por su posible importancia en la reorganización cortical después de una lesión medular.

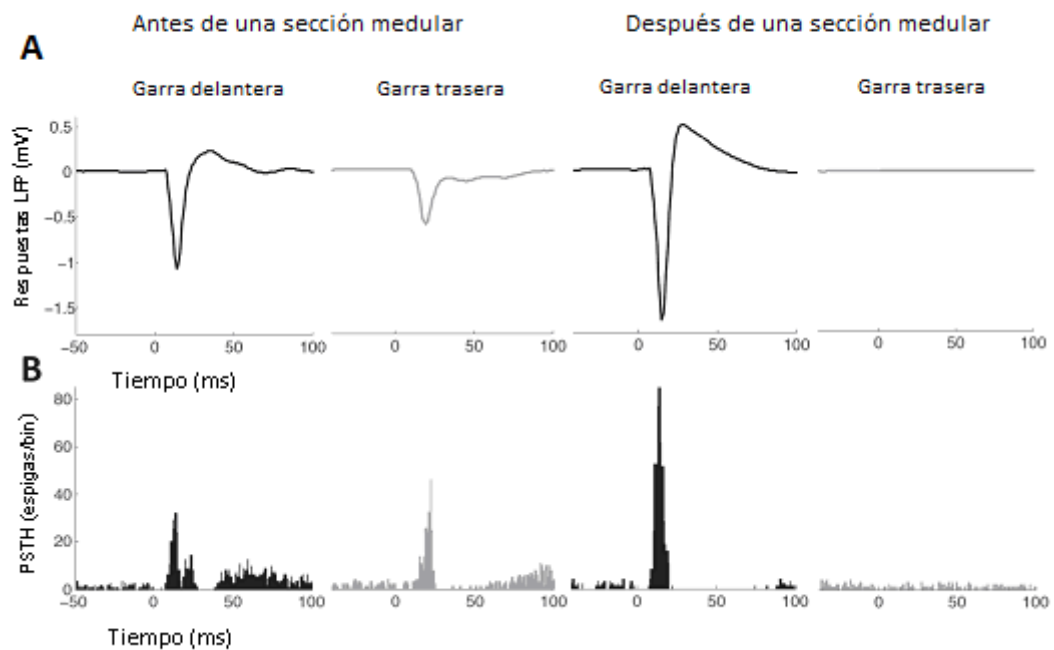


Figura 14: Cambios en las respuestas corticales. (A) Promedio de las respuestas del potencial de campo local (LFP) de la corteza de la garra delantera evocadas por estimulación de la garra delantera (en negro) y respuestas de la corteza de la garra trasera evocadas por estimulación de la garra trasera (en gris) antes (izquierda) e inmediatamente después (derecha) de la sección torácica completa de la médula espinal en un animal representativo. (B) Histogramas de tiempo peri-estímulo (PSTHs) representando las respuestas multi-unitarias registradas desde los mismos electrodos. Las respuestas de LFP y PSTHs fueron evaluadas a partir de 100 estímulos. El tiempo 0 (en el eje de la x) representa el inicio del estímulo. La sección medular produce la pérdida completa de la respuesta evocada por la estimulación de la garra trasera, y un incremento de la respuesta evocada por la estimulación de la garra delantera.

	ANTES		DESPUÉS	
	Sección medular completa (n=14)			
	HP	FP	HP	FP
Amplitud de la respuesta de LFP a estímulos de alta intensidad (mV)	0.50±0.33	1.21±0.48	-	1.63±0.44
Amplitud de la respuesta de LFP a estímulos de baja intensidad (mV)	0.27±0.12	0.30±0.16	-	0.31±0.20
	Bloqueo farmacológico medular (n=8)			
	HP	FP	HP	FP
Amplitud de la respuesta de LFP a estímulos de alta intensidad (mV)	0.46±0.32	1.08±0.57	-	1.52±0.83
Amplitud de la respuesta de LFP a estímulos de baja intensidad (mV)	0.17±0.07	0.23±0.14	-	0.26±0.21
	Sin lesión ni bloqueo (n=9)			
	HP	FP	HP	FP
Amplitud de la respuesta de LFP a estímulos de alta intensidad (mV)	0.52±0.35	1.05±0.75	0.49±0.30	1.10±0.68
Amplitud de la respuesta de LFP a estímulos de baja intensidad (mV)	0.19±0.13	0.23±0.15	0.16±0.10	0.21±0.15

Tabla 1 Respuestas corticales antes e inmediatamente después de una sección torácica completa de la médula espinal, bloqueo farmacológico y control evocadas por estímulos de alta y baja intensidad.

5.1.2. Cambios de la actividad cortical espontánea

Una vez que obtuvimos como primer resultado el incremento de las respuestas en la corteza intacta después de lesión medular, fue necesario profundizar en los posibles mecanismos, a nivel cortical, que subyacen este fenómeno, y para ello se estudiaron los cambios inmediatos de la actividad cortical espontánea (Fig. 15).

En ratas intactas, la actividad cortical espontánea presentó un comportamiento característico de actividad delta (<4Hz) inducido por el anestésico utilizado, uretano (Clement et al., 2008), en el cual se alternan periodos de actividad sincrónica (estados activados) con periodos de silencios

(estados silentes) corticales. Este comportamiento fue evidente en la actividad multi-unitaria (MUA), y se cuantificó tomando como medida la frecuencia principal del espectro del MUA rectificado (rMUA). Dicha frecuencia principal se correspondió con la alternancia de estados activados y silentes, siendo en animales intactos de 1.00 ± 0.67 Hz para la corteza de la garra delantera (rango 0.37-2.3 Hz) y 1.10 ± 0.86 Hz en la corteza de la garra trasera (rango 0.37-2.94Hz), con una alta correlación entre las 2 cortezas (Pearson: $r=0.97$, $p<0.0001$, $n=12$; en dos animales, el registro del MUA de la corteza de la garra trasera tenía una señal pobre frente al ruido base del registro, así que ambos animales fueron excluidos de estos análisis). Después de realizar la sección torácica de la médula, la alternancia entre los estados activados y silentes se convirtió en una alternancia más lenta, mostrando una frecuencia principal de la señal rMUA de 0.50 ± 0.12 Hz (rango 0.37-0.69 Hz) en la corteza de garra trasera y en 0.50 ± 0.10 Hz (rango 0.37-0.69 Hz) en la corteza de la garra delantera (ANOVA de dos vías; factor tiempo, antes y después de lesión ; $p=0.0024$; factor electrodo, de garra trasera y delantera: $p=0.75$; interacción: $p=0.77$; $n=12$). De nuevo existió una alta correlación entre las dos cortezas (Pearson: $r=0.97$, $p<0.0001$). El cambio en la actividad cortical desde actividad delta a una oscilación lenta fue más evidente cuando la situación de partida presentaba una frecuencia delta alta (3-4Hz) (como en fig. 15). La actividad oscilatoria cortical con frecuencia <1 Hz se denomina actividad cortical en onda lenta, similar a la actividad que se observa durante el sueño de onda lenta y estados de anestesia más profunda (Steriade et al., 1993; Crunelli y Hughes, 2010). Esta alternancia más lenta entre estados activados y silentes después de una sección torácica medular correspondió a una actividad cortical espontánea más silente de una forma global, como se muestra por un decremento de la media de la amplitud del MUA rectificado, que se cuantificó como se ha descrito en la figura 11 de materiales y métodos (ANOVA de dos vías; factor antes y después de lesión: $p=0.0031$; factor garra delantera-trasera: $p=0.42$; interacción: $p=0.13$; $n=12$).

Por tanto la lesión medular genera un cambio en la actividad cortical espontánea: si el animal intacto presenta una actividad cortical correspondiente a un estado de anestesia ligera (estado III-3), tras la lesión se genera una actividad en onda lenta correspondiente a un estado de anestesia más profunda (estado III-4).

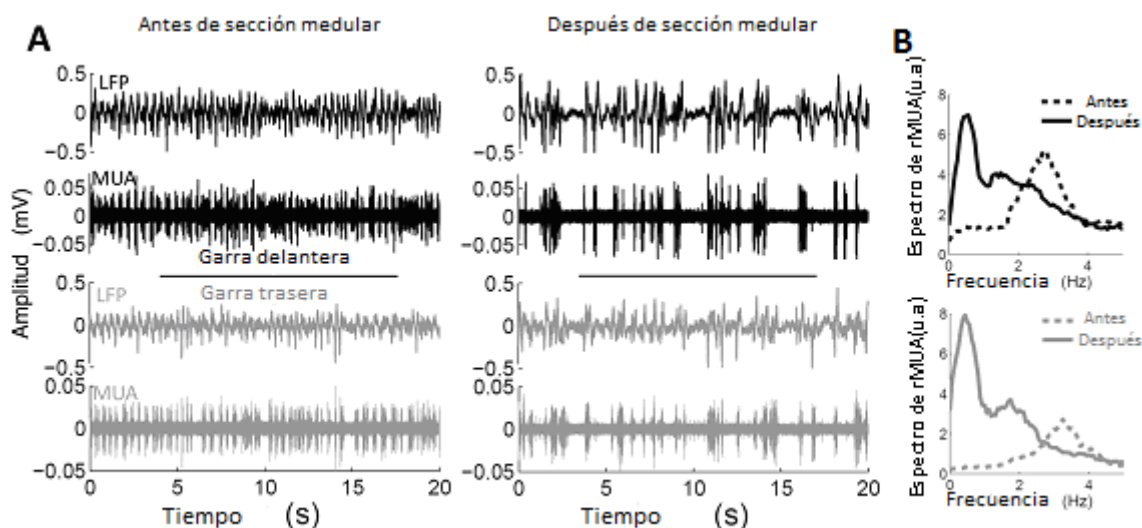


Figura 15: Cambios de la actividad cortical espontánea. (A) Ejemplos de registros espontáneos de potenciales de campo local (LFPs) durante 20 segundos y actividad multi-unitaria (MUA) en la corteza de la garra delantera (en negro) y en la corteza de la garra trasera (en gris) antes (izquierda) e inmediatamente después (derecha) de una sección torácica completa en un animal. (B) Espectro del rectificado del MUA (rMUA) correspondiente a los registros mostrados en (A). Antes de la lesión medular, la corteza somatosensorial estaba oscilando en una frecuencia delta (alrededor de 3Hz), pero la oscilación pasó a ser una actividad de onda lenta (0.5 Hz) después de la sección medular.

5.1.3. Relación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas

Con el fin de entender la relación entre la actividad cortical espontánea más lenta/más silente y el incremento de las respuestas de la garra delantera, se estudió si el nivel de actividad cortical espontánea que precedía a cada estimulación de la garra delantera afectaba a la respuesta de LFP evocada por los estímulos eléctricos (Fig. 16A).

En ratas intactas ($n=14$), se encontró una clara correlación inversa entre la actividad espontánea y la respuesta de la garra delantera (Fig. 16 B, C): cuanto mayor fue el valor de la señal rMUA previa al estímulo (100ms), menor fue el voltaje de la respuesta de LFP evocada por el estímulo, es decir, cuando el estímulo sucedía en un estado activado (valor de rMUA elevado) la respuesta evocada fue menor (respuesta LFP pequeña), mientras que cuando el estímulo sucedía en un estado silente (rMUA bajo) la respuesta evocada fue mayor (respuesta LFP grande) (Pearson: $r<-0.96$, $p<0.0001$; Fig. 16C). Después de la sección medular, esta correlación inversa se mantuvo ($r<-0.93$, $p<0.0001$; Fig. 16C). La pendiente (S) de esta correlación inversa entre la actividad espontánea (en μV) y respuestas evocadas (en mV) fue mucho más pronunciada para los estímulos de alta intensidad (antes de sección medular, $S=-0.110$; después de la sección, $S=-0.168$) comparada con los obtenidos por estímulos de baja intensidad (antes de sección medular, $S=-0.056$; después de sección, $S=-0.067$) (Fig. 16C). Este fenómeno puede ser debido a que los estímulos de baja intensidad reclutan una menor cantidad de neuronas que los estímulos de alta intensidad.

En síntesis, si partimos de un estado de anestesia ligera (estado III-3), que se caracteriza por una actividad cortical relativamente activada, después de lesión medular se genera una actividad en onda lenta (estado III-4), que se caracteriza por una oscilación de estados silentes y activados. Durante la actividad en onda lenta es más probable que un estímulo suceda en un estado silente que durante anestesia ligera ya que después de lesión existen más estados silentes. Como las respuestas corticales son más grandes en estados silentes que en estados activados, podemos entender que las respuestas evocadas promediadas después de lesión sean más grandes. Por tanto, la lesión medular produce un cambio en la actividad espontánea cortical que a su vez produce un incremento en las respuestas de la corteza somatosensorial intacta.

5.1.4. Cambios en la corteza desaferentada

Se ha descrito que la lesión medular produce una reorganización cortical a largo plazo. Este fenómeno se ha estudiado principalmente como una invasión de la zona cortical desaferentada por la corteza intacta (Hofstetter et al., 2003; Endo et al., 2007; Ghosh et al., 2010). Esta reorganización a largo plazo se construye sobre una conectividad cortico-cortical entre la garra delantera y la garra trasera que ya está presente en animales intactos (Moxon et al., 2008). Esta conectividad cortico-cortical también se observa en nuestros resultados, donde la estimulación eléctrica de la garra delantera genera no solo una respuesta evocada en la correspondiente corteza de la garra delantera, sino también una respuesta evocada en la corteza de la garra trasera, que queda desaferentada después de la lesión. Los cambios en la corteza desaferentada se describe en los apartados que siguen.

Para garantizar que la actividad registrada sea de origen local, es decir, generada en la región de la garra trasera (antes y después de lesión), se utilizó la actividad multi-unitaria rectificadas (rMUA) evocada por la estimulación a alta intensidad de la garra delantera. Este análisis se llevó a cabo en animales con un buen registro de la actividad multi-unitaria en la garra trasera (12 animales de los 14 que se han utilizado en esta parte del estudio). Tras este análisis observamos 2 tipos de respuestas en la corteza desaferentada (Fig. 16D):

- 1) Respuestas de corta latencia (<30ms)
- 2) Activaciones de larga latencia (>50ms)

Las respuestas de corta latencia son típicas respuestas somatosensoriales del mismo tipo que las respuestas no homólogas descritas por Moxon et al. (2008). Se cuantificó el porcentaje de animales que presentó respuestas de corta latencia, siendo en 7 de 12 animales (58%) antes de la sección medular y 7 de 12 animales (58%) después de ella. Por tanto no hubo cambio en la probabilidad de aparición de las respuestas de corta latencia tras la lesión.

Las activaciones de larga latencia son estados activados generados en la corteza de la garra delantera por la estimulación periférica que se propagan a la corteza de la garra trasera. Se llevó a cabo la cuantificación del porcentaje de animales que mostraron activaciones de larga latencia en la corteza de la garra trasera por estimulación de la garra delantera. Antes de la lesión medular las activaciones de larga latencia aparecieron en 5 de 12 animales (42%) y después de la lesión aparecieron en 9 de 12 animales (75%). De forma más detallada, observamos que en los animales en los que la corteza se encontraba en un estado oscilatorio más rápido (antes de la sección medular) el estímulo de la garra delantera no generaba estados activados (porque la corteza ya estaba activada); sin embargo, cuando la corteza se encontraba en un estado de onda lenta (después de la sección medular), el estímulo de la garra delantera generaba estados activados que se propagaban a la región cortical desaferentada (Fig. 12E). El aumento de la probabilidad de observar activaciones de larga latencia en la corteza desaferentada en respuesta a estímulos de la garra delantera (inmediatamente después de la sección torácica de la médula) es otra consecuencia del cambio del estado cortical inducido por la lesión medular.

Estos resultados indican que inmediatamente después de una lesión medular la corteza desaferentada es invadida por la actividad generada en la corteza intacta. Por tanto, el cambio de estado tras la lesión puede ser un factor que favorezca la reorganización cortical.

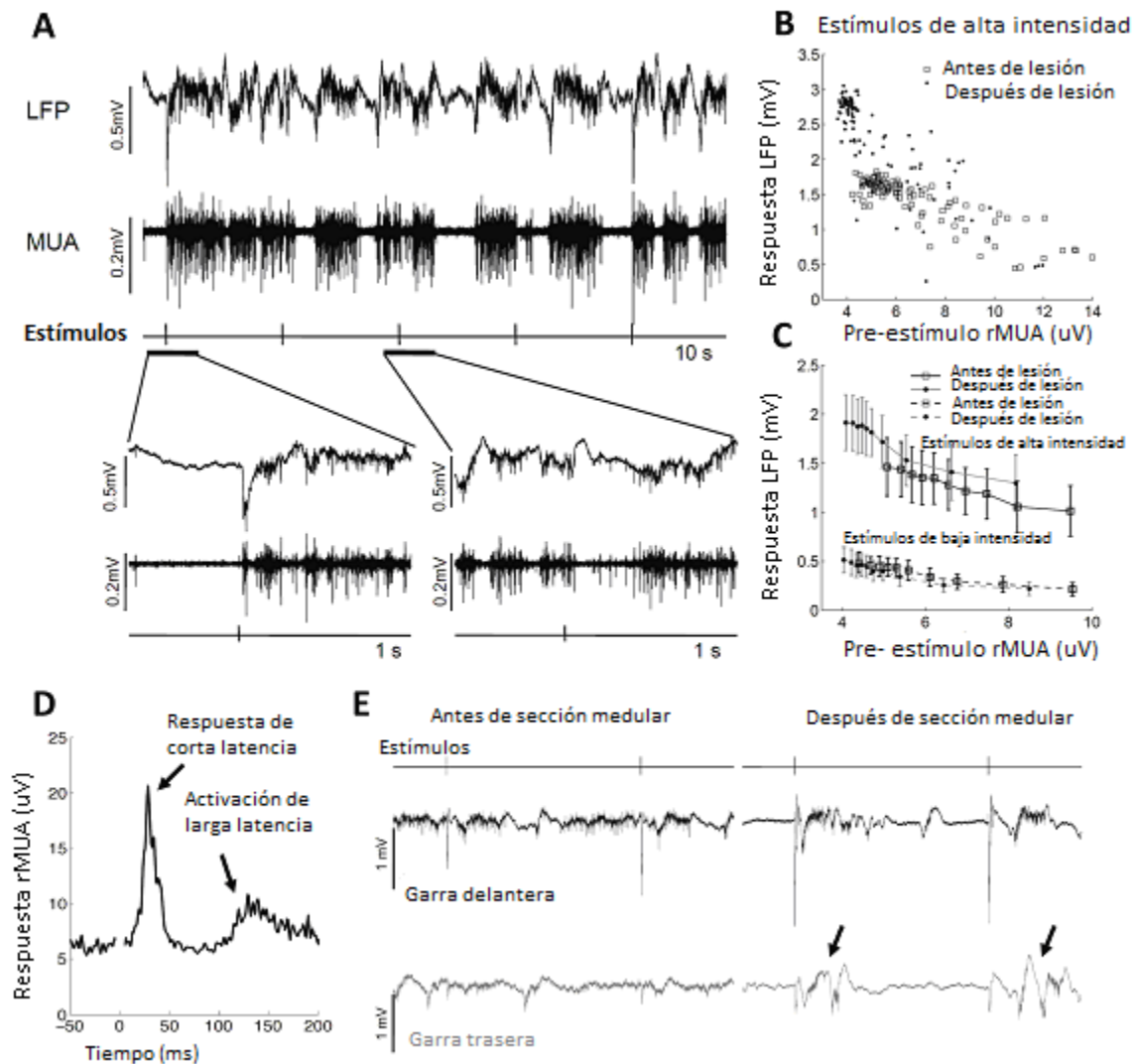


Figura 16: Relación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas. (A) Ejemplo de registro de 10 segundos de potenciales de campo local (LFP) y actividad multiunitaria (MUA) en respuesta a estímulos eléctricos cada 2 segundos. El tiempo alrededor de dos estímulos representativos se expande en la parte inferior: si inmediatamente antes del estímulo la corteza está silente, entonces la respuesta de LFP es mayor; si inmediatamente antes del estímulo la corteza está activa, entonces la respuesta de LFP es menor. (B) Datos de estímulos individuales en un animal representativo: en el eje x se representa el rectificado del MUA antes del estímulo y en el eje y la respuesta del LFP para 100 estímulos de alta intensidad antes (cuadros vacíos) y después (puntos rellenos) de la sección torácica de la médula espinal. (C) Datos agrupados de todos los animales (n=14). Para cada animal, los estímulos se ordenaron basándose sobre el rectificado del MUA antes del estímulo y la respuesta de LFP se promedió en bloques de 10 estímulos, obteniendo 10 puntos por animal, los cuales se promediaron finalmente entre todos los animales. Las barras de error indican intervalos de

confianza del 95%. El aumento de las respuestas evocadas está correlacionado con la actividad espontánea más silente después de la sección medular. **(D)** Promedio de las respuestas de la señal de rMUA evocadas en la corteza de la garra trasera por estímulos de alta intensidad en la garra delantera después de una sección medular en un animal representativo que mostraba tanto respuestas de corta latencia como activaciones de larga latencia. La señal alrededor del tiempo 0 se eliminó para que no apareciera el artefacto del estímulo. **(E)** Ejemplo de registros de LFP en dos estímulos consecutivos de alta intensidad de la garra delantera (intervalo de 2 segundos entre estímulos) antes (izquierda) y después (derecha) de la sección medular. Durante la actividad de onda lenta, los estímulos de alta intensidad de la garra delantera generan estados activados en la corteza de la garra delantera que se propagan a la corteza de la garra trasera, generando activaciones de larga latencia (flechas).

5.1.5. Bloqueo farmacológico de la médula espinal

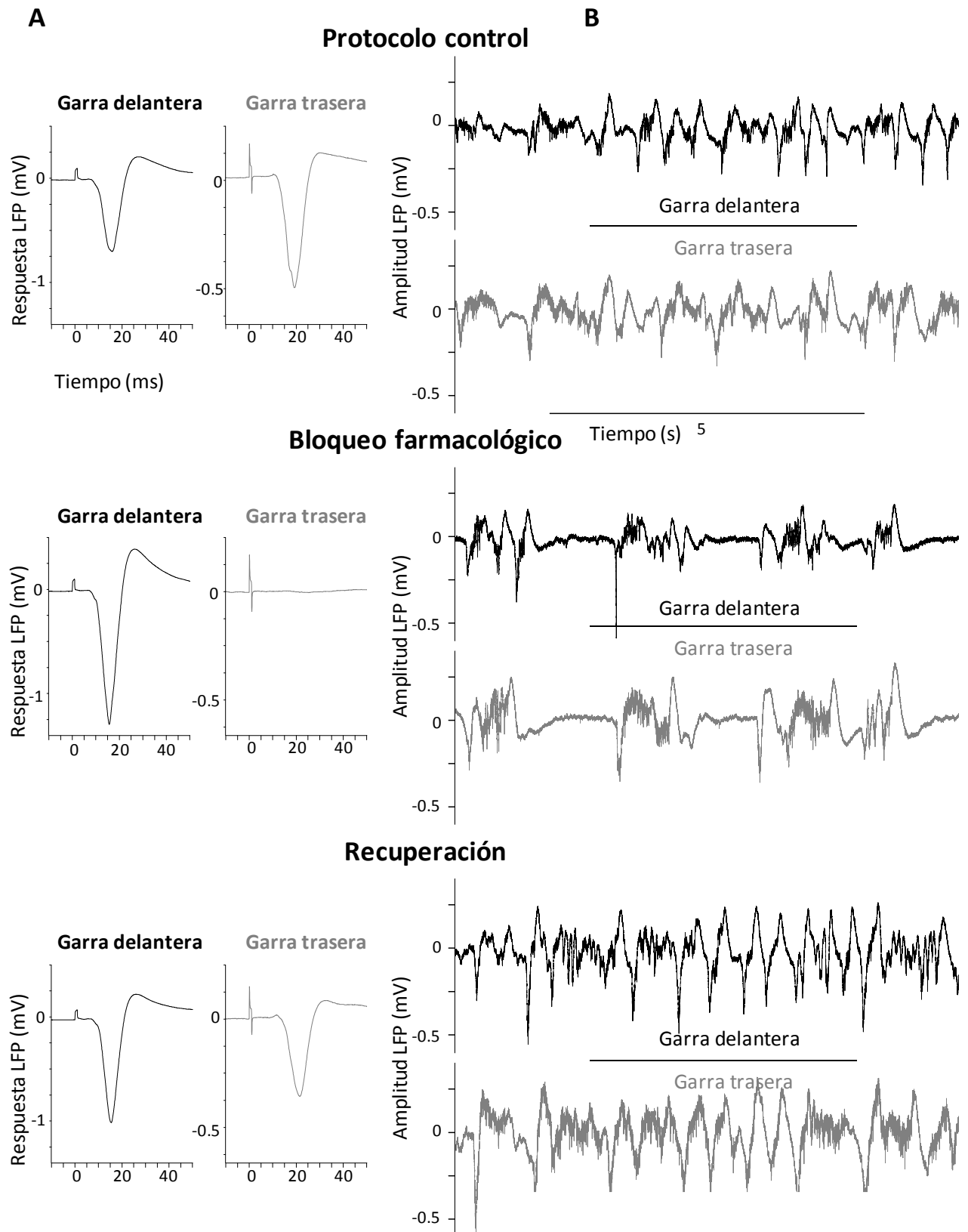
Para verificar que la actividad cortical espontánea más lenta/silente y el aumento de las respuestas de la garra delantera fueran específicamente debidos a la desaferentación, realizamos un grupo de experimentos en los cuales la conducción axonal en la médula espinal fue bloqueada transitoriamente usando lidocaína o TTX (tetrodotoxina) (Fig. 17). Estos experimentos fueron particularmente desafiantes por la dificultad que conlleva la difusión local de dichos bloqueantes en la médula sin lesionarla. Para ello el modelo experimental utilizado fue el mismo que en los casos de lesión medular: registros simultáneos de las regiones corticales correspondientes a la garra delantera y trasera de un hemisferio. Se realizó una laminectomía a nivel T9-T10 manteniendo la duramadre intacta. Una vez obtenidos los registros en situación control, se procedió a abrir la duramadre y extraer la piamadre de esa zona medular, se aplicó tópicamente la lidocaína, y se colocó una pieza de algodón, embebida en la misma solución, en esa zona torácica de la médula. Una vez aplicada la lidocaína se procedió a estimular eléctricamente la garra trasera hasta verificar el bloqueo de la médula debido a la inexistencia de respuesta cortical evocada por la estimulación periférica de la garra trasera (Fig.17A, B).

Una vez bloqueada la médula se procedió a estudiar tanto la actividad espontánea como la actividad evocada en ambas cortezas somatosensoriales por estímulos de la garra delantera. De la misma forma, se confirmó que el bloqueo fue local y no difundió hacia regiones rostrales de la médula espinal. Sólo los animales en los cuales el bloqueo farmacológico fue completo y reversible se incluyeron en este estudio (n=8, Fig. 17 A, B).

Los resultados que obtuvimos con el bloqueo farmacológico fueron muy similares a los obtenidos con la sección medular (Tabla 1). Las respuestas corticales de la garra trasera al estímulo de dicha zona corporal desaparecieron con el bloqueo farmacológico de la médula espinal, lo que confirmó la eficacia de esta desaferentación sensorial sin daño físico. Las respuestas corticales de la garra delantera al estímulo de su zona corporal incrementaron su magnitud significativamente después del bloqueo (Fig. 17A; ANOVA de dos vías, factor tiempo, antes y después del bloqueo: $p=0.0069$; $n=8$), particularmente en respuesta a estímulos de alta intensidad (interacción: $p=0.127$; Tukey: $p=0.0040$), pero no en respuesta a estímulos de baja intensidad (Tukey: $p=0.99$). Del mismo modo, se produjo el cambio de estado cortical en la actividad espontánea, es decir, la frecuencia de los estados activados y silentes (corteza de la garra trasera: 1.05 ± 0.57 Hz; y delantera: 0.92 ± 0.56 Hz) fue significativamente más baja después del bloqueo farmacológico (corteza de la garra trasera: 0.73 ± 0.37 Hz; y delantera: 0.71 ± 0.34 Hz), como se muestra con el pico del espectro de frecuencia de la señal rMUA (Fig. 17B,C; ANOVA de dos vías; factor tiempo, antes y después de bloqueo: $p=0.0137$; factor electrodo, corteza de la garra trasera y delantera: $p=0.75$; interacción: $p=0.54$; $n=7$). También se observó la disminución del voltaje medio de la señal rMUA (ANOVA de dos vías; factor antes y después de la lesión: $p=0.0140$; factor de garra trasera frente a garra delantera: $p=0.58$; interacción: $p=0.34$; $n=7$). Estos cambios en la actividad espontánea correlacionaron con los cambios en las

respuestas evocadas de forma similar a los experimentos con sección medular como detallamos anteriormente (Fig. 17D).

El bloqueo farmacológico de la médula espinal a nivel torácico muestra los mismos resultados que los experimentos con lesión medular: tanto el cambio de estado cortical como el incremento de las respuestas en la corteza intacta. Ello nos demuestra que todo efecto observado tras lesión medular es debido a la desaferentación sensorial y no al shock producido por el daño físico.



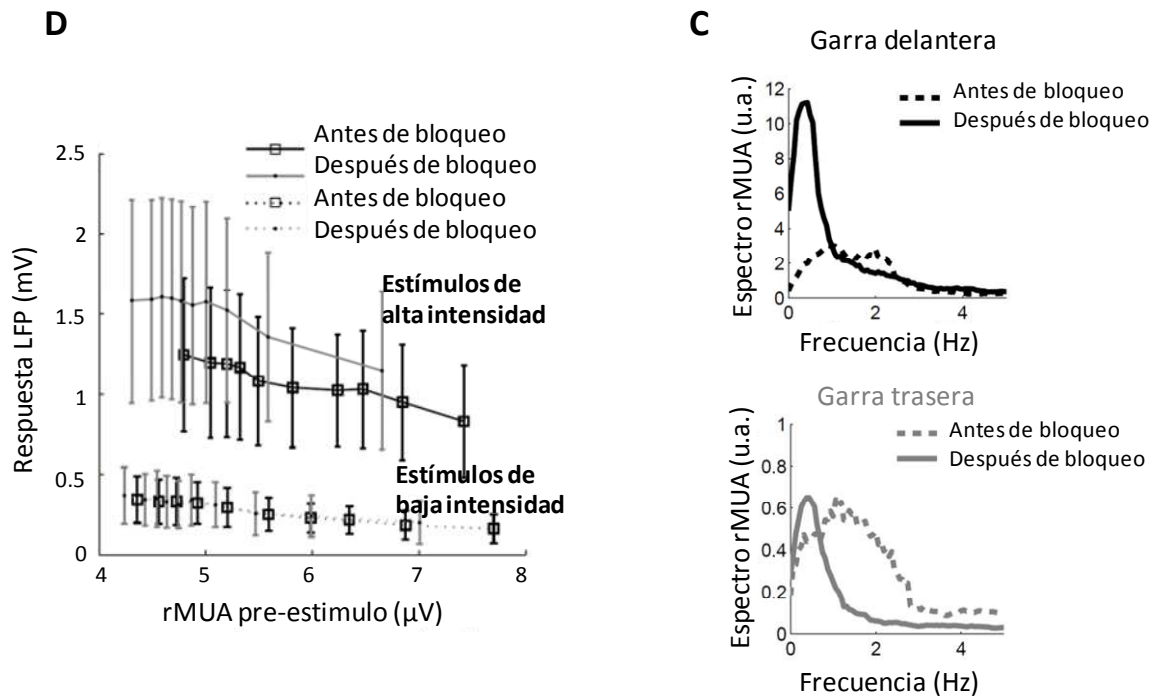


Figura 17: Cambios corticales después del bloqueo farmacológico de la médula espinal. (A) Cambios en las respuestas corticales en un animal representativo (como en la figura 9A) y recuperación. **(B, C)** Cambios en la actividad cortical espontánea en un animal representativo: (B) cambios en los registros de la actividad cortical espontánea durante el bloqueo y la recuperación, y (C) frecuencia principal del espectro que muestra el cambio tras el bloqueo farmacológico de la médula espinal (como en figura 10 A, B). **(D)** Relación entre la actividad espontánea y las respuestas evocadas en todos los animales ($n=8$) (como en figura 16C). Los cambios corticales observados después del bloqueo farmacológico de la médula fueron muy similares a los observados después de la sección medular.

5.1.6. Experimento control durante anestesia ligera

Realizamos un grupo de experimentos en los cuales los animales se sometieron al mismo protocolo experimental, pero no se realizó ni lesión medular ni bloqueo farmacológico de la médula espinal ($n=9$). Cada protocolo en estos experimentos duraban el mismo tiempo que en los experimentos donde se realizaba la lesión medular o el bloqueo farmacológico, aproximadamente una hora. Las respuestas corticales y la actividad espontánea se evaluaron antes y después del “control”, que se correspondía con el mismo

tiempo en el que se llevaba a cabo la lesión medular o el bloqueo farmacológico.

La amplitud de la respuesta de LFP evocadas en la corteza correspondiente a la garra delantera por estímulos de su garra no cambió después del “control” (ANOVA de dos vías, factor tiempo, antes y después de “control”: $p=0.92$; $n=9$). Del mismo modo, el pico del espectro de la señal rMUA no cambió después del “control” (ANOVA de dos vías, factor tiempo, antes y después de “control”: $p=0.40$; $n=7$), y tampoco hubo una disminución de la amplitud del voltaje medio de la señal rMUA (ANOVA de dos vías, factor tiempo, antes y después de “control”: $p=0.72$; $n=7$).

Estos datos sugieren que es poco probable que los resultados, tanto el cambio de actividad cortical espontánea como evocada, observados después de la sección medular estén relacionados con alteraciones inespecíficas inducidas por los procedimientos experimentales y, por tanto, confirmamos que sean debidos a la desaferentación medular.

5.1.7. *Requerimientos de anestesia en animales lesionados*

El resultado principal de la primera parte de nuestro estudio es que una lesión medular produce un cambio de estado cortical, de ritmo delta a onda lenta. Este estado en onda lenta es similar al que se observa durante sueño o en un estado de anestesia profundo. Según Friedberg et al. (1999), Erchova et al. (2002) y otros autores, los estados corticales se pueden modular según diferentes niveles de anestesia, es decir, en estos trabajos se puede observar como un estado en ritmo delta pasa a un estado en onda lenta con una dosis suplementaria de anestesia. Ello sugiere que el estado observado tras lesión medular podría representar un nivel de anestesia más profundo que antes de lesión. Para verificar esta hipótesis, hicimos un estudio para comparar la cantidad de anestesia necesaria para mantener un estado de anestesia estable durante varios protocolos de estimulación en animales intactos ($n=9$,

experimento control) con respecto a los animales con lesión medular (n=11, experimento principal).

Para controlar la profundidad de anestesia del animal, que se quería mantener en un estado entre III-3 y III-4 (Fig 18A y B), utilizamos los registros corticales y los reflejos evocados por estímulos nocivos: tanto el reflejo que se genera tras pinchar la garra delantera como el reflejo corneal. Los reflejos generados por pinchazos en la garra delantera se observan en un estado de anestesia III-2 pero no en un estado III-3 y el reflejo corneal disminuye en un estado de anestesia III-3, así que estos reflejos nos proporciona una buena medida comportamental con respecto al nivel de anestesia del animal (Friedberg et al.,1999). Estos reflejos fueron evaluados al menos una vez antes de empezar cada protocolo y también observábamos si existía la presencia de movimientos de vibras (Friedberg et al., 1999). Como señal neurofisiológica de activación, consideramos una electroencefalografía desincronizada con un patrón de disparo tónico (Fig.18C) durante al menos 20 minutos. En este intervalo de tiempo, en animales anestesiados con uretano deberían existir 2 fluctuaciones entre estado activado y onda lenta (Clement et al., 2008). La dosis suplementaria de anestesia, necesarias para mantener el animal estable, tenían un rango entre 0.1 y 0.4 de la dosis inicial.

En los animales con la médula intacta, para mantener el nivel de anestesia estable se proporcionaron dosis suplementarias de uretano (0.26 ± 0.07 de la dosis inicial) cada 2.3 protocolos (un rango de 1 a 3 protocolos, donde cada protocolo duraba aproximadamente una hora) después de la “lesión control” y se observó además que sobrevivieron 7.8 ± 2.8 protocolos después de la “lesión control” (un rango de 4 a 13 protocolos). En el séptimo protocolo después de la lesión control, el promedio de la dosis acumulada de uretano fue de 1.64 ± 0.19 de la dosis original. En los animales lesionados (con una lesión real de la médula espinal a nivel T9-10, n=11), para mantener el nivel de anestesia estable se proporcionaron dosis suplementarias de uretano

(0.15 ± 0.06 de la dosis original, $P < 0.0001$) cada 4.4 protocolos (un rango de 2 a 8 protocolos) después de la lesión medular ($P < 0.0001$) y se observó además que sobrevivieron 9.1 ± 3.0 protocolos después de la lesión medular (rango de 3 a 13 protocolos), lo cual no fue significativamente diferente de los animales controles ($P = 0.24$). La dosis acumulada fue significativamente menor en los animales seccionados comparado con los animales con la médula intacta, empezando desde el primer protocolo después de lesión medular ($P = 0.0186$), ya que nunca se suministró anestesia entre el protocolo control y el protocolo realizado inmediatamente después de lesión (este primer protocolo post lesión es el que se utilizó para estudiar los cambios de actividad evocada y espontánea descritos anteriormente) La significatividad de la diferencia entre las dosis acumuladas en cada grupo de animales aumentó progresivamente en los protocolos siguientes ($P = 0.0011$, $P = 0.0003$, etc.). En el séptimo protocolo después de lesión medular, el promedio de la dosis acumulada de uretano fue sólo de 1.13 ± 0.14 de la dosis original (Figura 19).

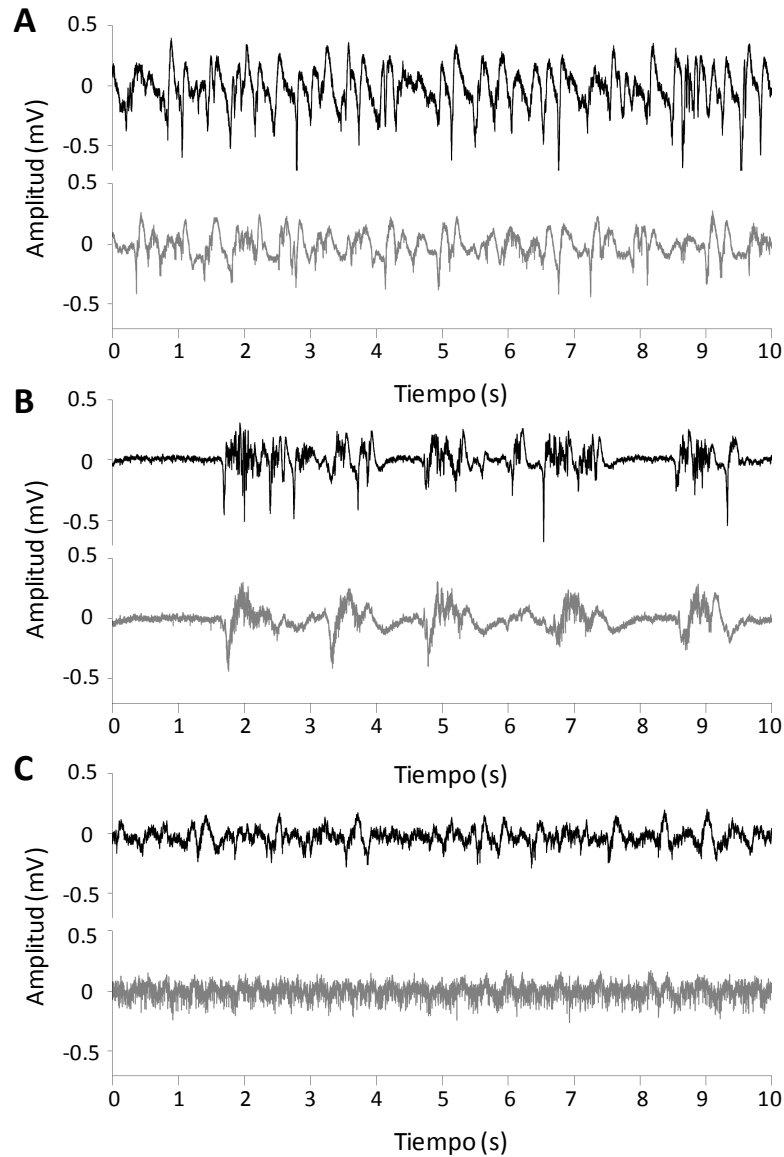


Figura 18: Registros corticales fueron usados para monitorizar la profundidad de la anestesia. (A-C) Registros representativos de 10 segundos de la corteza somatosensorial primaria perteneciente a la representación de la garra delantera (trazo superior negro) y de la garra trasera (trazo inferior gris): (A) Oscilación delta (1-4Hz) típicamente observado en animales intactos, (B) actividad de onda lenta (<1Hz) típicamente observado después de lesión medular, y (C) registro que muestra una activación que indica la necesidad de una dosis adicional de anestesia (patrón de disparo tónico en c).

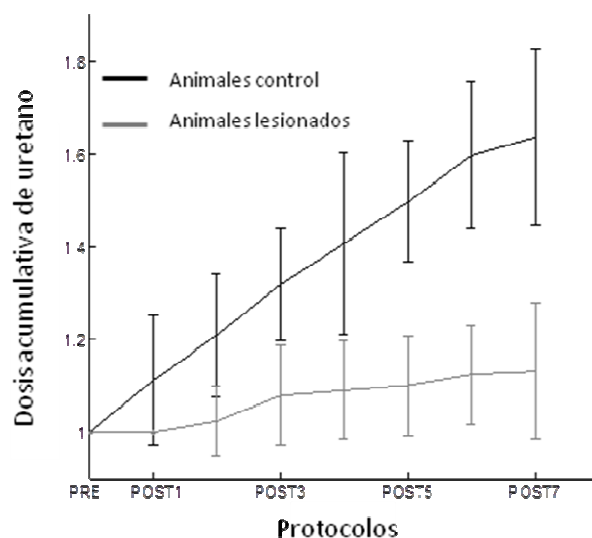


Figura 19: La lesión medular disminuye los requerimientos de anestesia. El promedio de dosis acumuladas normalizadas – siendo dado como una fracción de la dosis inicial de uretano – para los animales control con una “lesión control” (n=9 animales, línea negra) y animales seccionados con una lesión medular completa torácica (n=11, línea gris). Las barras de error indican la desviación estándar. Las dosis suplementarias de uretano fueron dadas antes del protocolo indicado en el eje x. La duración de cada protocolo fue de una hora aproximadamente.

Estos resultados muestran que los animales con lesión medular tienen menores requerimientos de anestesia respecto a los animales intactos, lo que podría tener una gran importancia a nivel clínico, y se procederá a discutir en la sección de discusión de este trabajo.

5.2. Cambios corticales independientes del estado.

Los resultados obtenidos, con el primer objetivo, permitieron determinar que la lesión medular produce un cambio de estado en la actividad espontánea cortical que modula las respuestas evocadas. Al observar de nuevo la figura 16B mostrada anteriormente y los datos relacionados con este análisis, se pueden separar 2 amplitudes diferentes de LFP para el mismo valor de actividad previa.

Este fenómeno sugiere que podría existir un mecanismo independiente del estado que contribuya al cambio en las respuestas evocadas. Para testar esta hipótesis, diseñamos un modelo experimental que nos permitiera controlar el estado y así diferenciar los cambios debidos al estado y los cambios independientes del estado. Para ello realizamos registros simultáneos de la corteza somatosensorial primaria donde se encuentran representadas la garra delantera y trasera, y estudiamos tanto los potenciales de campo como la actividad multi-unitaria en respuesta a estimulación periférica de ambas extremidades bajo 3 condiciones experimentales diferentes en el mismo animal: (1) animal con médula intacta bajo un estado de anestesia ligera (estado III-3; Friedberg et al., 1999; Fig. 20A), es decir, con un estado similar del que partimos en los experimentos del primer objetivo; (2) animal con médula intacta bajo un estado de anestesia profunda (estado III-4; Friedberg et al., 1999; Erchova et al. 2002; Fig.20B), es decir, con un estado en onda lenta similar al que se observó después de lesión medular en los experimentos del primero objetivo; e (3) inmediatamente después de lesión medular torácica completa (Fig. 20C). Con este abordaje experimental, comparando las dos primeras condiciones podemos determinar los cambios dependientes de estado, y comparando las condiciones de anestesia profunda y de después de lesión podemos determinar los cambios independientes del estado.

5.2.1. Actividad espontánea

El estado de la corteza somatosensorial primaria fue cuantificado durante periodos de actividad espontánea (>150s) por la distribución de voltaje de la actividad multi-unitaria rectificada (Fig. 20), el voltaje medio de la señal rMUA y la frecuencia principal del espectro.

El estudio de distribución de voltaje de la señal rMUA se utilizó para caracterizar las distintas condiciones experimentales (anestesia ligera, profunda y lesión medular). En condiciones de anestesia ligera, la corteza somatosensorial

mostró un estado relativamente activado (Fig. 20A), caracterizado por una distribución de voltaje monomodal, es decir, una alta probabilidad de que la actividad multi-unitaria rectificada se encuentre en un alto voltaje (Fig. 20D negro). Tras realizar el protocolo en estado de anestesia ligera se suministró al animal una dosis adicional ($<1/6$ de la dosis inicial) de anestesia, lo cual produjo un cambio de estado cortical hacia onda lenta manteniendo la médula espinal intacta ($<1\text{Hz}$; Steriade et al., 1994; Crunelli y Hughes, 2010; Fig.20B). Este estado de onda lenta se caracteriza por una típica distribución bimodal de la señal del MUA rectificado (Fig. 20D, gris oscuro continuo), representando el estado silente en un pico estrecho de bajo voltaje y el estado activado en un pico ancho de alto voltaje. Inmediatamente después del protocolo de estimulación, se realizó una lesión medular completa a nivel torácico, por tanto con los animales ya en un estado de anestesia profunda, se mantuvo la actividad cortical en un estado de onda lenta tras lesión y se volvió a realizar un protocolo de estimulación ($<1\text{Hz}$; Fig. 20C).

El resultado de este análisis muestra que tanto la condición durante anestesia profunda como después de lesión presentan la misma distribución bimodal y, por tanto, el mismo estado cortical (Fig.20E, línea gris oscuro y gris claro) mientras que la condición durante anestesia ligera presenta una distribución de voltaje diferente a las dos condiciones anteriores, lo que significa que su estado cortical es diferente a ambas condiciones (Fig.20E, línea negra con respecto al gris oscuro y gris claro). Los análisis estadísticos - sobre la media y la moda de la distribución de la señal rMUA - confirmaron los cambios en el estado cortical entre anestesia profunda y ligera (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $F(2,20) \geq 30.6$, $p < 0.0001$; Tukey: $p \leq 0.0002$) y la ausencia de los cambios adicionales en el estado cortical entre anestesia profunda y después de lesión medular completa (Tukey $p \geq 0.88$)(Fig. 20E).

Para el estudio de la actividad cortical se utilizó también la medida de frecuencia principal del espectro de la señal rMUA, que confirma que no existe

cambio en el estado cortical entre la condición de anestesia profunda y después de lesión medular, tanto en la zona correspondiente a la garra trasera o desaferentada (pre: $0.57 \pm 0.13 \text{ Hz}$; post: $0.57 \pm 0.14 \text{ Hz}$) como en la zona de la garra delantera o intacta (pre: $0.58 \pm 0.14 \text{ Hz}$; post: $0.50 \pm 0.12 \text{ Hz}$) (factor tiempo: $F(1,10)=0.8$, $p=0.40$).

Las diferentes medidas utilizadas para cuantificar y caracterizar el estado cortical de la actividad espontánea nos confirmaron la existencia de cambio de estado entre la condición de anestesia ligera y la de anestesia profunda, y nos permitieron controlar que no existiera cambio de estado entre la condición de anestesia profunda y después de lesión medular.

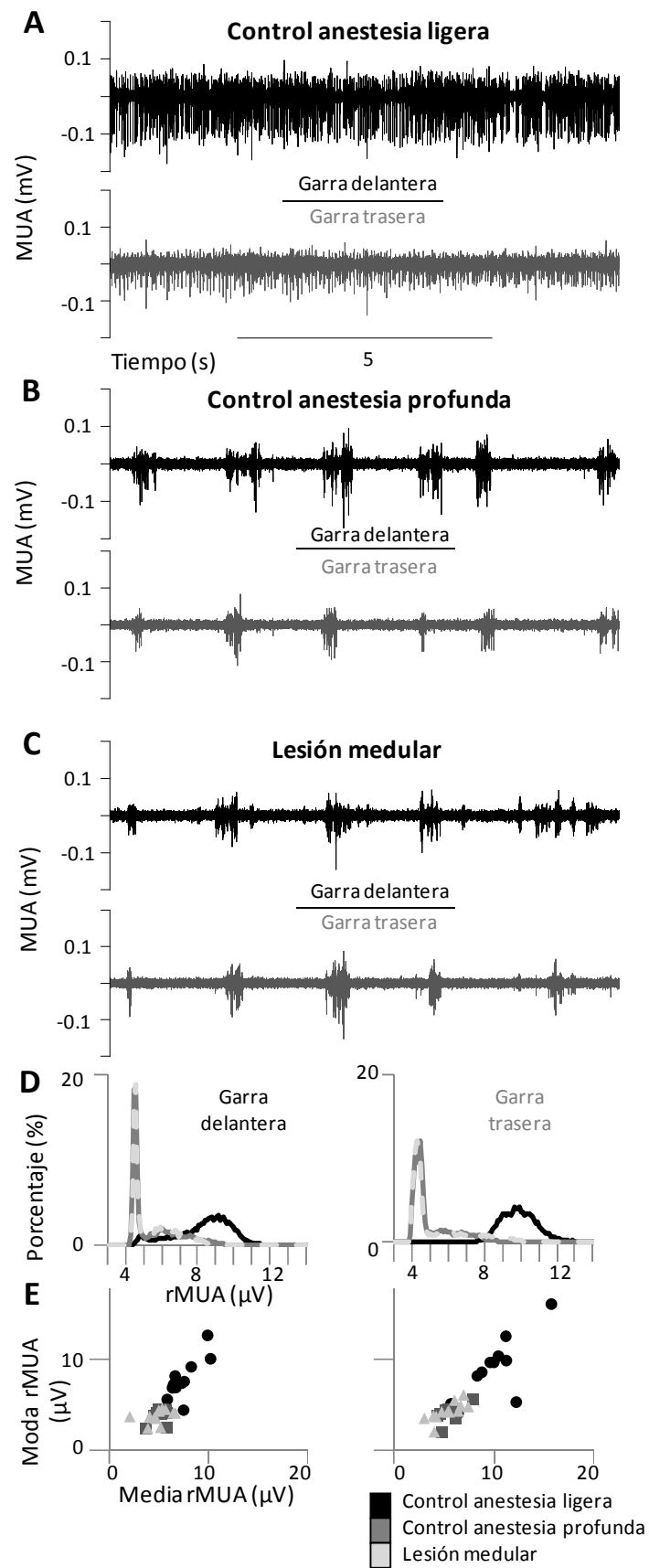


Figura 20: Actividad espontánea (A-C). La actividad multi-unitaria espontánea (MUA) simultáneamente registrada en la corteza de la garra delantera (registro negro) y la corteza de la garra trasera (registro gris) bajo tres condiciones diferentes en un animal representativo: (A) Animal control bajo anestesia ligera, (B) animal control bajo anestesia profunda y (C) inmediatamente después (<1 hora) de una lesión medular completa a nivel torácico. (D) Distribución del MUA rectificado (rMUA) en un animal representativo y (E) gráficos de dispersión de la media y moda de la señal rMUA de toda la población. La actividad cortical espontánea disminuye después de una dosis de anestesia adicional pero no se afectada por la lesión medular.

5.2.2. Caracterización de las respuestas evocadas en la corteza somatosensorial intacta: dependencia e independencia del estado

Con el apartado anterior definimos los estados corticales existentes en las diferentes condiciones experimentales en el mismo animal. Con este modelo experimental podemos separar los cambios en las respuestas corticales evocadas dependientes e independientes del estado asociados a una lesión medular completa. Para ello se analizaron las respuestas de las diferentes zonas corticales evocadas por estímulos periféricos en las distintas zonas corporales, comparando las 3 condiciones experimentales (animal intacto durante anestesia ligera, profunda y después de lesión medular) en el mismo animal.

Las respuestas de LFP de la corteza de garra delantera evocadas por estímulos en la garra delantera en la condición de anestesia ligera mostraron una mayor amplitud que las respuestas de la corteza de garra trasera por estímulo en la garra trasera (Fig. 21A, negro; Tabla 2), lo cual es consistente con los datos obtenidos en el primer objetivo. Además, al comparar el promedio de las respuestas corticales de la garra delantera en la condición de anestesia ligera con la de anestesia profunda confirmamos el aumento de la respuesta debido al cambio de estado (Fig. 21A, izquierda, gris oscuro; tabla 2). Estos incrementos en las amplitudes de los LFP fueron observados en respuesta a la estimulación de alta intensidad (5mA) (ANOVA de dos vías, factor de interacción: $F(2,20)=14.1$,

$p=0.0001$; Tukey: $p=0.0020$; Fig. 21B izquierda), pero no alcanzó significancia estadística en respuesta a estímulo de baja intensidad (0.5mA)(Tabla 2). El incremento de la amplitud de la respuesta se encontraba asociado a un aumento de las latencias (ANOVA de una vía: $F(2,18)=12.3$ $p=0.0004$; Tukey: 0.0031 ; Fig. 21B derecha), lo cual es consistente con la dependencia del estado como se ha mostrado en otros trabajos (Aguilar y Castro-Alamancos, 2005; Hirata y Castro-Alamancos, 2011). Este incremento de la amplitud y latencia de la respuesta fue observado también en el promedio de las respuestas evocadas en la corteza de garra trasera por estímulo de garra trasera (Fig. 21A derecha, gris oscuro; Tabla 2). Estos resultados sobre los cambios corticales asociados al cambio de estado coinciden con los resultados obtenidos en el primer objetivo.

A continuación, procedimos a analizar los cambios corticales independientes del estado cortical después de lesión medular. Al comparar el promedio de las respuestas de la garra delantera en condición de anestesia profunda frente al promedio de las respuestas después de lesión observamos un incremento de la amplitud de la respuesta después de dicha lesión medular (Fig. 21A izquierda, punteado gris claro; Tabla 2). Este incremento de la amplitud fue específicamente observado en respuesta a estímulos de alta intensidad (Tukey: $p=0.0064$; Fig.21B izquierda), pero ello no alcanzó significancia estadística a estímulos de baja intensidad (Tabla 2). En este caso, tras lesión medular el aumento de la respuesta no se vió asociado al cambio de la latencia debido a la ausencia de cambio de estado entre ambas condiciones (Tukey: $p=0.74$; Fig. 21B, derecha).

El incremento de las amplitudes dependiente del estado en las respuestas evocadas del LFP después de una dosis adicional de anestesia estuvo asociado con una disminución en la duración de la inhibición después de la respuesta excitatoria (desde 116.4 ± 30.0 ms a 44.8 ± 45.7 ms; ANOVA de una vía: $F(2,18)=8.3$, $P=0.0028$; Tukey: $p=0.0063$), mientras que el incremento independiente del estado de la amplitud de las respuestas del LFP después de la

lesión medular estuvo asociado con un incremento en la duración de la inhibición (desde 44.8 ± 45.7 ms a 113.4 ± 74.2 ms; Tukey. $p=0.0069$), como se evidencia en las respuestas de la actividad multi-unitaria rectificada (Fig. 21C derecha). De hecho, cuando la corteza estaba con una actividad en onda lenta la respuesta del LFP y la duración de la inhibición local después de la respuesta excitatoria estaban positivamente correlacionadas (Pearson: $r>0.5$; Fig 21C derecha).

Juntando estos resultados con los resultados obtenidos en el primer objetivo, podemos decir que la lesión medular genera cambios corticales dependientes e independientes del estado de la actividad cortical del animal. Los cambios dependientes del estado son: aumento de la latencia y de la magnitud de respuesta, y una disminución de inhibición intracortical asociada al estímulo. Los cambios independientes del estado son: incremento de las respuestas corticales y un aumento de la inhibición intracortical.

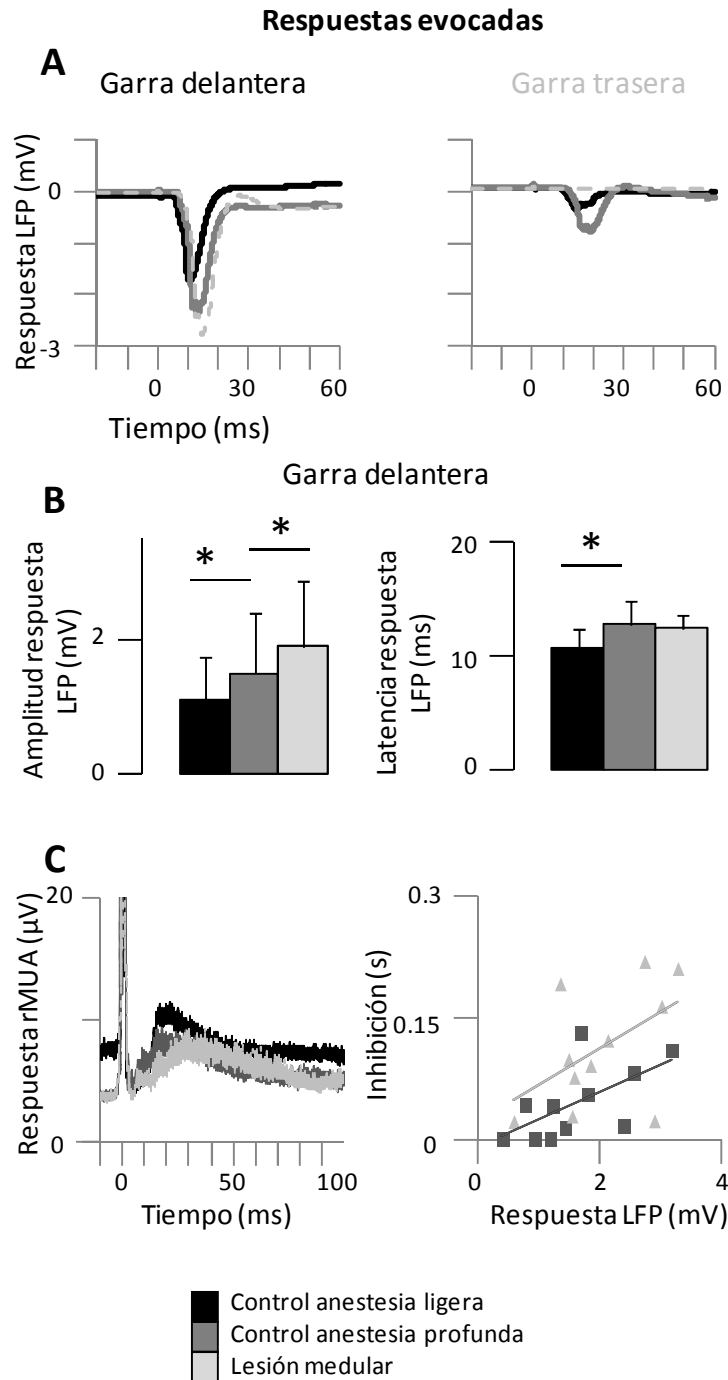


Figura 21: Promedio de las respuestas evocadas en la corteza intacta de la garra delantera por estímulos de la garra delantera. (A) Promedio de las respuestas del potencial de campo local (LFP) evocadas por estímulos de alta intensidad (5mA) en la garra delantera (izquierda) o garra trasera (derecha) en un animal representativo. (B) Medidas agrupadas de las respuestas evocadas de todos los animales: amplitud (izquierda) y latencias (derecha) de las respuestas evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulos de la garra delantera. Las barras representan las medias, las barras de error son desviaciones estándar. Los asteriscos indican

diferencias significativas entre condiciones adyacentes (ver texto). (C) Inhibición que aparece después de la respuesta. (Izquierda) Gran promedio de las respuestas evocadas de la señal rMUA en corteza de garra delantera. Las respuestas de la señal rMUA están truncadas en 20 μ V para focalizarse en la inhibición que aparece después de la respuesta. (Derecha) Correlación entre las respuestas de LFP (eje x) y la duración de la inhibición (eje y) de todos los animales. No existe ningún cambio en la actividad cortical espontánea entre el control con un estado de anestesia profunda y la lesión medular, sin embargo las respuestas evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulo de esa extremidad y la inhibición existente tras la respuesta crecen después de la lesión medular completa a nivel torácico.

	CONTROL ANESTESIA LIGERA		CONTROL ANESTESIA PROFUNDA		LESIÓN MEDULAR	
	Lesión medular (n=12)					
	HP	FP	HP	FP	HP	FP
Estímulo de baja intensidad (mV)	0.24±0.21	0.24±0.08	0.29±0.21	0.28±0.14	-	0.38±0.26
Estímulo de alta intensidad (mV)	0.50±0.28	1.09±0.63	0.71±0.35	1.49±0.89 DOWN: 1.67±0.98 UP: 0.91±0.56	-	1.89±0.97 DOWN: 2.12±1.04 UP: 1.43±0.83
	Control 2 (n=8)					
			HP	FP	HP	FP
Estímulo de baja intensidad (mV)			0.15±0.12	0.23±0.15	0.13±0.10	0.22±0.21
Estímulo de alta intensidad (mV)			0.43±0.26	1.34±0.95	0.51±0.34	1.32±0.73

Los valores son medias \pm desviaciones estándar.

Tabla 2: Amplitudes de las respuestas corticales del LFP antes e inmediatamente después de una lesión medular completa a nivel torácico o de una lesión control.

5.2.3. Relación entre la actividad espontánea cortical y las respuestas evocadas en cada estímulo de forma individual

Como se ha explicado previamente, el uso de dosis suplementarias de anestesia nos permitió controlar el estado cortical, obteniendo una condición con el animal intacto en un estado de anestesia ligera, otra condición con el animal intacto en un estado de anestesia profunda y finalmente el mismo estado de anestesia profunda (onda lenta) después de lesión medular. En nuestros datos, los estímulos que sucedieron durante los estados activados tanto en la condición de anestesia ligera como profunda serían equivalentes, al igual que los estímulos que sucedieron durante estados activados después de lesión medular. En cualquiera de las tres condiciones experimentales, la modulación de la respuesta al estímulo depende de la actividad multiunitaria local inmediata previa (Fig.22A), por tanto realizamos un análisis similar al del que se realizó en el primer objetivo, donde se comparaba la actividad previa al estímulo con la respuesta evocada.

En estos experimentos, focalizamos la atención sobre la relación entre actividad espontánea cortical de la garra delantera inmediatamente antes de cada estímulo de dicha garra – medido como la media del voltaje de la señal rMUA en los 50ms previos al estímulo (Fig. 22B, C) – y la correspondiente respuesta de LFP de dicha garra delantera en cada estímulo (Fig. 22D, E). En animales con la médula intacta, la amplitud de las respuestas de LFP tuvo una relación inversa con la actividad previa al estímulo, es decir, a mayor actividad previa al estímulo menor amplitud de respuesta evocada. Por lo tanto, durante el estado de anestesia ligera la mayoría de las respuestas se agruparon con una amplitud menor ya que presentaban antes del estímulo una alta actividad multiunitaria rectificadas (Fig. 22G, negro, Pearson $r=-0.83$). Durante el estado de anestesia más profunda la mayoría de las respuestas se agrupaban con una amplitud mayor ya que la actividad multi-unitaria que precedía al estímulo era menor, coincidiendo con estados silentes (Fig. 22G, gris oscuro; $r=-0.93$).

Después de la lesión medular, las respuestas incrementaron su amplitud para todo el rango de la señal rMUA que precedía al estímulo (Fig. 22G, gris claro; $r=0.93$). Es decir, para el mismo nivel de actividad espontánea local previa al estímulo, las respuestas evocadas que se asociaban a dicho estímulo fueron mayores, lo cual remarca la independencia del estado en estas respuestas evocadas. Del análisis conjunto de la actividad de la señal rMUA antes del estímulo y la respuesta evocada de cada estímulo, podíamos separar claramente cambios dependientes del estado e independientes del estado en las respuestas evocadas corticales (Fig. 22F, G). Durante las oscilaciones corticales de onda lenta los valores más bajos de la actividad multi-unitaria rectificada antes del estímulo se corresponden con los estados silentes (DOWN) y los valores más altos de esta actividad multi-unitaria se corresponden a estados activados (UP). El siguiente paso fue promediar las respuestas (ver Fig. 21) pero separando los estímulos en dos grupos: 1) estímulos sucedidos en un estado cortical silente (DOWN) y 2) estímulos sucedidos en un estado cortical activado (UP) (Fig. 18H, I). Las respuestas incrementadas de la garra delantera después de la lesión medular fueron observadas tanto en el promedio de estímulos que sucedieron en DOWN como en el promedio de estímulos que sucedieron en UP, siempre en estímulos de alta intensidad (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $F(1,11)=22.5$, $p=0.0006$; factor interacción: $F(1,11)=0.06$, $p=0.81$; Tabla 2). De nuevo se confirmó con este análisis que las respuestas evocadas incrementaron después de lesión de forma independiente del estado.

Con este análisis del estudio de los estímulos de forma individual y el de los estímulos agrupados en UP y DOWN, pudimos separar la reorganización cortical independiente y dependiente del estado debido a la separación de los estados de actividad cortical (silente y activada) después de lesión medular (Fig. 22 G y H).

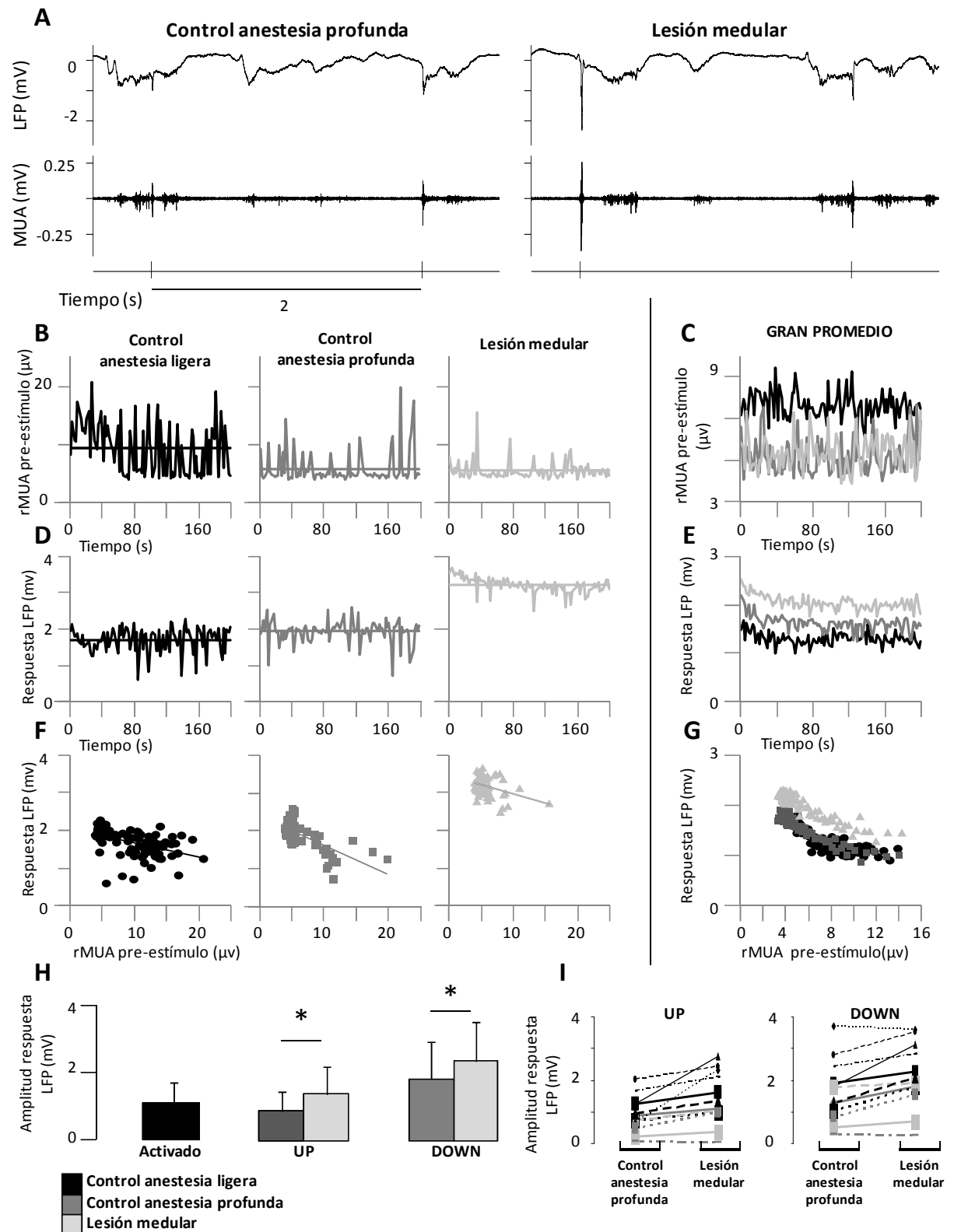


Figura 22: Relación entre la actividad espontánea cortical y las respuestas evocadas en cada estímulo de forma individual. (A) Respuestas evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulos de alta intensidad en un animal representativo bajo un estado de anestesia

profunda (izquierda) e inmediatamente después de una lesión medular completa a nivel torácico (derecha). Se están mostrando los registros de LFP (en la parte superior) y MUA (en la parte inferior) alrededor de dos estímulos individuales que suceden durante un estado activado (UP) y silente (DOWN). (B-C) Análisis de la actividad espontánea en los 50ms antes de cada estímulo de forma individual (media de la señal rMUA): (B) animal representativo y (C) gran promedio de todos los animales. Cada valor corresponde a un estímulo individual, que sucede cada 2 segundos (eje x). La media de la señal rMUA antes del estímulo en los registros evocados confirma los resultados en los registros espontáneos (Fig. 20). (D-E) Análisis de las respuestas evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulos de alta intensidad en la garra delantera, considerando cada estímulo de forma individual (amplitud de LFP): (D) animal representativo y (E) gran promedio de todos los animales. (F-G) Análisis conjunto de la actividad espontánea (eje x) y respuestas evocadas (eje y): (F) animal representativo y (G) gran promedio de todos los animales. (H-I) Amplitudes de las respuestas evocadas después de separar los estímulos en base a si estos suceden en un estado silente (valores bajos de la señal rMUA antes del estímulo) o activado (valores más altos de la señal rMUA antes del estímulo). (H) Medidas de todos los animales agrupadas, mostrando las amplitudes de las respuestas en los diferentes estados corticales. Las barras muestran las medias, las barras de error son las desviaciones estándar. (I) Variabilidad entre los animales. En síntesis, cuando analizamos la señal rMUA antes del estímulo y las respuestas de LFP en cada estímulo, esencialmente confirmamos y extendimos los resultados de Fig. 15 y 16: (i) cambio en estado cortical inducido por anestesia, (ii) ausencia de cambio adicional en el estado cortical inducido por lesión medular bajo una condición de anestesia profunda, (iii) aumento de las respuestas dependientes del estado en la corteza de la garra delantera evocadas por estímulos de su extremidad después de anestesia, (iv) Aumento de las respuestas independientemente del estado en la corteza de la garra delantera evocadas por estímulo de su extremidad después de lesión medular. Las respuestas en la corteza de la garra delantera evocadas por estímulos de su extremidad incrementan inmediatamente después de una lesión medular torácica tanto cuando el estímulo sucede en un estado cortical activado como silente.

5.2.4. Experimentos adicionales: consistencia espacial, especificidad espacial y controles

Debido al tipo de estimulación utilizado en nuestros experimentos podemos asumir que los estímulos de alta intensidad activan toda la representación de la garra en la corteza cerebral. Para verificar que el efecto del incremento de las respuestas en la corteza intacta estuvo presente en toda su representación cortical, en 10 de 12 experimentos se situó un tercer electrodo en la corteza de la garra delantera entre los 2 electrodos originales (Fig. 23A). Ambos electrodos mostraron el mismo incremento independiente del estado en las respuestas de la corteza de garra delantera evocadas por estímulos de alta intensidad de esa extremidad después de la lesión medular (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $F(1,9)=13.6$, $p=0.005$; interacción: $F(1,9)=0.02$, $p=0.89$; Fig. 23B,C), confirmando la consistencia espacial de nuestros resultados en la corteza de la garra delantera. Es decir, este incremento en la amplitud de las respuestas no depende de un campo receptor óptimo si no de toda la zona cortical que representa el área corporal de la garra delantera del animal.

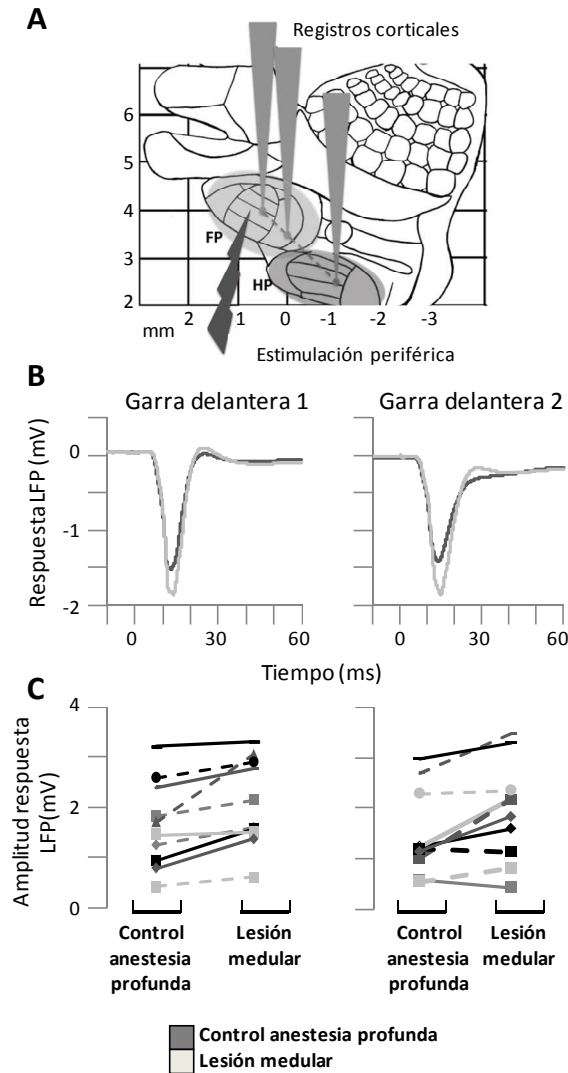


Figura 23: Consistencia espacial en la corteza de la garra delantera. (A) Diagrama que representa el protocolo experimental: sobre un mapa esquemático de la corteza somatosensorial primaria, los conos grises representan las localizaciones de registro en el área de la garra delantera (FP) y el área de la garra trasera (HP) y el relámpago representa el estímulo periférico eléctrico en la garra delantera. (B) Gran promedio de las respuestas de LFP en los dos electrodos en la corteza de la garra delantera evocadas por estímulos de alta intensidad de la garra delantera antes e inmediatamente después de la lesión medular bajo un nivel de anestesia profunda. (C) Variabilidad de la amplitud de las respuestas de LFP entre animales. Ambos electrodos en la corteza de la garra delantera muestran el mismo incremento independientemente del estado cortical en las respuestas evocadas por estímulos de alta intensidad de la garra delantera después de lesión medular, lo que confirma la consistencia espacial de nuestros resultados.

Hasta aquí mostrábamos que inmediatamente después de la lesión medular, la corteza intacta de la garra delantera responde con mayor magnitud al mismo estímulo de la garra delantera. A continuación nos preguntamos si otra zona cortical, no afectada por la lesión medular, sufría el mismo efecto que la corteza de la garra delantera. Para abordar esta cuestión, en un grupo de experimentos adicionales (n=8 animales) realizamos registros extracelulares de la corteza somatosensorial correspondiente a la garra delantera y a las vibrisas del animal (Fig 24A). El incremento de las respuestas corticales después de la lesión medular fue confirmado en la corteza de la garra delantera (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $F(1,14)=11.9$, $p=0.0038$; factor interacción: $F(1,14)=3.7$, $p=0.07534$; Tukey, $p=0.0094$) pero no fue estadísticamente significativo en la corteza de vibrisas (Tukey, $p=0.70$; Fig. 24B, C), lo que soporta la especificidad espacial de nuestros resultados.

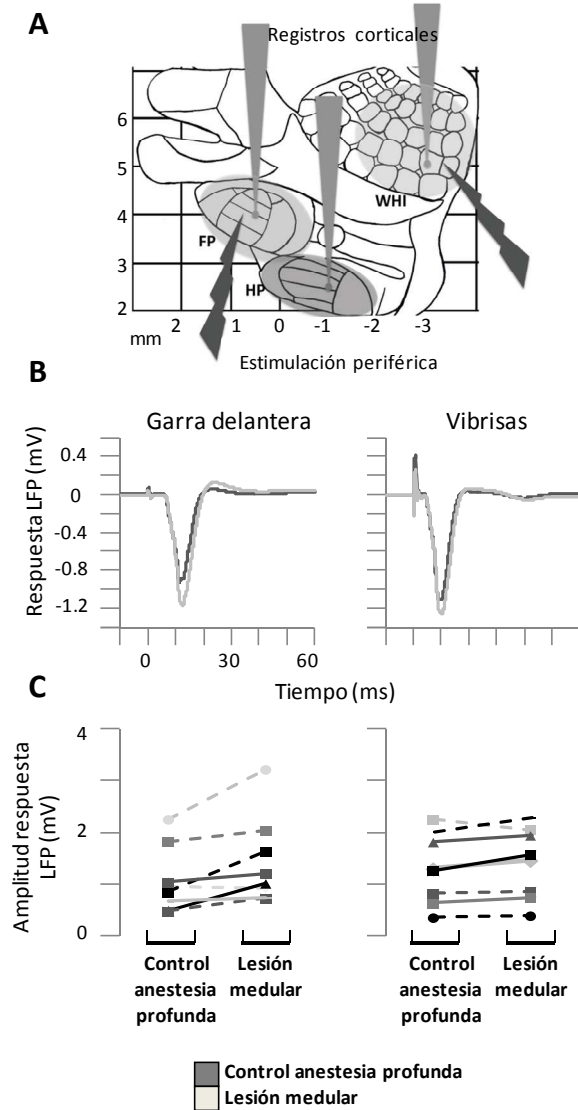


Figura 24: Especificidad espacial (corteza de la garra delantera vs vibrisas) (A) Diagrama que representa el protocolo experimental: sobre un mapa esquemático de la corteza somatosensorial primaria, los conos grises representan las localizaciones de registro en el área de la garra delantera (FP), el área de la garra trasera (HP) y el área de las vibrisas (WHI), y el relámpago representa el estímulo periférico eléctrico en la garra delantera o en las vibrisas. (B) Gran promedio de las respuestas de LFP en la corteza de la garra delantera evocadas por estímulos de alta intensidad de la garra delantera y en la corteza de las vibrisas evocadas por estímulos de las vibrisas antes e inmediatamente después de la lesión medular bajo un nivel de anestesia profunda. (C) Variabilidad de la amplitud de las respuestas de LFP entre animales. El incremento de las respuestas corticales después de lesión medular fue confirmado en la

corteza de la garra delantera pero no se apreciaba en la corteza de las vibrisas, lo cual soporta la especificidad espacial de nuestros resultados.

Se ha demostrado que la actividad de onda lenta, durante el sueño, puede generar fenómenos plásticos (Chauvette et al., 2012). Para confirmar que la onda lenta en nuestros resultados no generó fenómenos de plasticidad inmediatos asociados a ella, realizamos una serie de experimentos (n=8 animales) en ratas con la médula intacta en las que se registró bajo un nivel de anestesia profundo antes y después de una “lesión control”. Los resultados confirmaron que no había efecto de la onda lenta sobre las respuestas evocadas a lo largo de todo el experimento (ANOVA de dos vías, factor tiempo: $F(1,7) < 0.1$, $p = 0.90$; factor interacción: $F(1,7) < 0.01$, $p = 0.96$; Tabla 2). Es decir, durante el estado continuado en onda lenta no se generaba ningún tipo de aumento en las respuestas corticales que indicase fenómenos de plasticidad en situación control.

En general, los resultados anteriores muestran que inmediatamente después de la lesión medular las respuestas de la corteza de la garra delantera (corteza intacta) evocadas por estímulos de la garra delantera (por encima del nivel de la lesión) incrementan en la ausencia de cambio de estado cortical, reflejando una inmediata reorganización cortical independiente del estado después de la lesión medular completa.

5.2.5. Respuestas evocadas en la corteza desaferentada de la garra trasera al estímulo de la garra trasera

Desde la perspectiva clásica, los trabajos de reorganización cortical después de lesión medular se han realizado estudiando los efectos de la estimulación en la garra intacta mientras se registraba en la corteza que sufría la desaferentación sensorial. Una vez establecido que la reorganización funcional independiente del estado ocurre en la corteza intacta de la garra delantera

inmediatamente después de la lesión medular, decidimos estudiar si esta reorganización independiente del estado también ocurría en la corteza desaferentada de la garra trasera. Para ello, primero utilizamos la actividad multi-unitaria rectificada (rMUA) - lo cual refleja la actividad global de las neuronas locales alrededor del electrodo - para cuantificar las respuestas evocadas en la corteza desaferentada de la garra trasera por estímulos de la garra delantera en los mismos animales en los que las respuestas de la garra delantera fueron analizadas anteriormente (n=12 animales). Como esperábamos por nuestros resultados ya obtenidos en el objetivo 1 (Fig. 16D, E), observamos dos tipos de “respuestas”: 1) respuesta de corta latencia (<50ms) y 2) activación de larga latencia (>50ms). Previamente mostramos que la activación de larga latencia sólo está presente durante la actividad cortical de onda lenta y es dependiente del estado ya que representa estados activados generados en la corteza de la garra delantera que se propagan a la corteza de la garra trasera. En esta parte del trabajo estudiamos específicamente los cambios independientes del estado que ocurren después de una lesión medular en las respuestas de corta latencia, ya que estas respuestas no cambiaban su probabilidad de aparición antes y después de lesión en los experimentos del primer objetivo (por cambio de estado). La magnitud (substrayendo el ruido de base de la señal) de las respuestas de corta latencia, evocadas por estímulo de alta intensidad de la garra delantera en la corteza desaferentada de la garra trasera, no cambió entre el estado de anestesia ligera y profunda (ANOVA una vía: $F(2,20)=4.7$, $p=0.0208$; Tukey: $p=0.90$) pero incrementó significativamente después de la lesión medular (Tukey: $p=0.0254$; Fig. 25A-C).

Para entender mejor esta reorganización cortical funcional a nivel celular, en experimentos adicionales (n=5 animales) realizamos registros yuxtacelulares e intracelulares para estudiar el potencial de acción y las respuestas del potencial de membrana de las neuronas individuales (Fig. 25D, E). Para reducir la variabilidad y considerar sólo los cambios independientes del estado, en los

registros intracelulares sólo utilizamos los estímulos que sucedían en un estado silente. Estos experimentos confirmaron que los estímulos de alta intensidad de la garra delantera alcanzaban la corteza de la garra trasera en animales intactos, como se observó en los potenciales sinápticos de las neuronas individuales, pero estos potenciales sinápticos en la mayoría de los casos no alcanzaban el umbral para generar potenciales de acción (Fig. 25D). Después de la lesión medular, los potenciales sinápticos fueron mayores, con una alta probabilidad de alcanzar el umbral de la espiga (Fig. 25E). Más cuantitativamente, los resultados fueron los siguientes: i) el porcentaje de neuronas que respondieron con espigas fue del 33% (3 de 10) en animales intactos e incrementó a 89% (8 de 9) después de lesión medular (test de dos proporciones, $p=0.0238$); ii) la magnitud de la respuesta global incrementó desde 0.40 ± 0.60 espigas/estímulos ($n=10$ neuronas) en animales intactos a 0.81 ± 0.51 espigas/estímulos ($n=9$ neuronas) después de lesión medular (t-test no pareado, $p=0.0428$; Fig. 25F); iii) la amplitud de los promedios de los potenciales sinápticos incrementó desde 2.4 ± 2.0 (rango 0.5-5.3) mV ($n=4$ neuronas) en animales intactos a 7.0 ± 3.9 (rango 3.1- 11.1) mV ($n=5$) después de lesión medular (t-test no pareado de una cola, $p=0.0366$; Fig. 25G); iv) similarmente, la pendiente del promedio de los potenciales sinápticos incrementó desde 0.21 ± 0.17 (rango 0.06-0.41) mV/ms ($n=4$ neuronas) en animales intactos a 0.80 ± 0.43 (rango 0.41-1.47) mV/ms ($n=5$) después de lesión medular (t-test no pareado de 2 colas, $p=0.0362$; Fig. 25G).

En general, estos resultados sugieren que el incremento de la respuesta de corta latencia representa una reorganización funcional de la corteza desaferentada de la garra trasera independiente del estado después de la lesión medular. Con nuestros datos observamos que existía una correlación entre la reorganización de la corteza desaferentada (medida por el porcentaje de incremento de la respuestas de rMUA de corta latencia evocadas en la corteza de la garra trasera por estímulos de garra delantera) y la reorganización de la corteza intacta (medida por el porcentaje de incremento de las respuestas de

LFP evocadas en la corteza de la garra delantera por estímulos de la garra delantera) (Pearson: $r=0.70$, $p=0.017$, $n=11$; un animal fue excluido de este análisis). Esta correlación sugiere que la reorganización de la corteza intacta y la reorganización de la corteza deaferentada representan dos vistas complementarias de la misma reorganización inmediata después de la lesión medular (Fig. 25H).

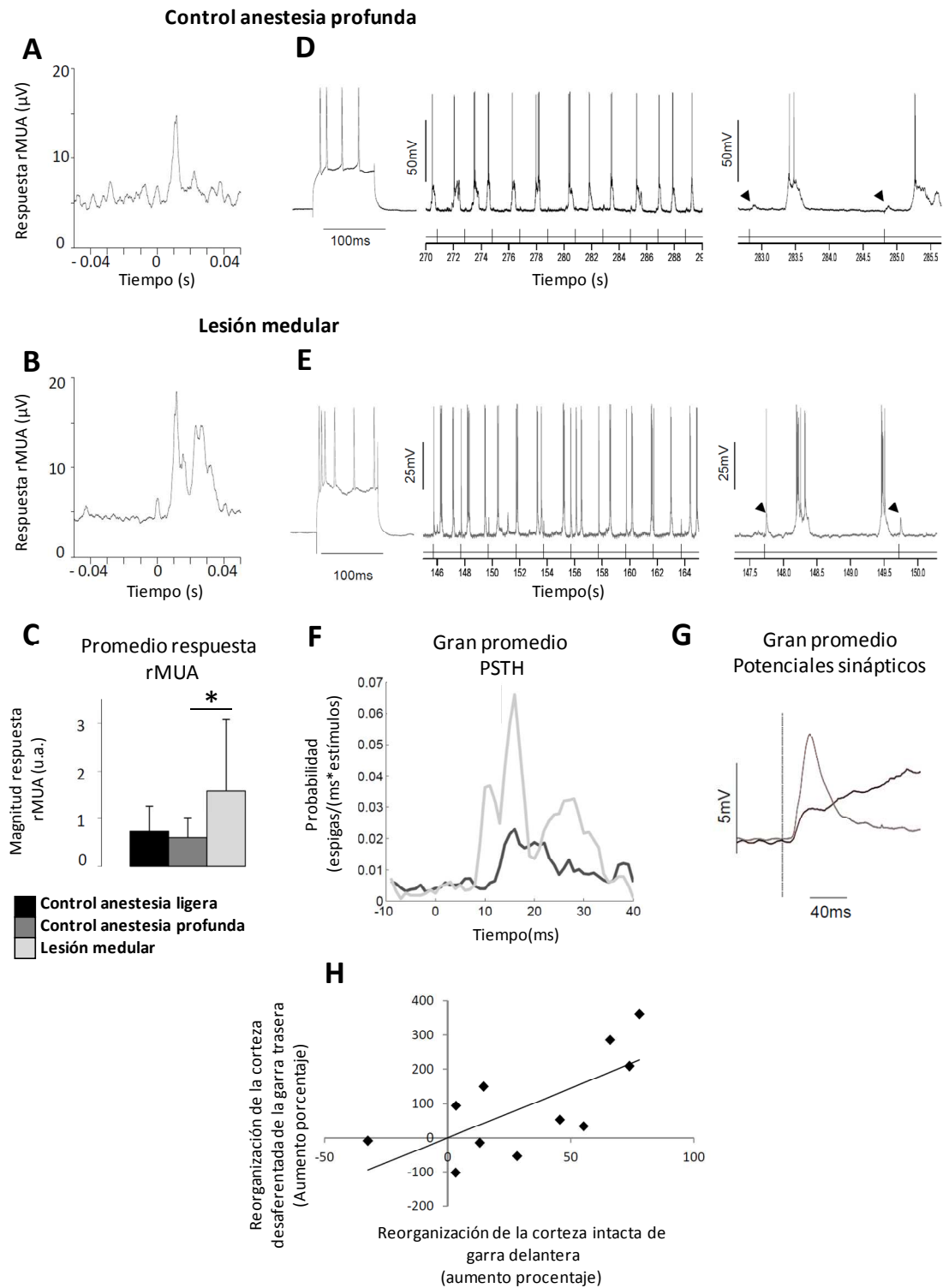


Figura 25: Respuestas evocadas en la corteza desaferentada de la garra trasera por estímulos de la garra delantera. (A-B) Promedio de las respuestas de rMUA de corta latencia evocadas en la corteza de la garra trasera por estímulos de alta intensidad de la garra delantera contralateral bajo dos condiciones diferentes en un animal representativo: (A) animal control

bajo un estado de anestesia profunda e (B) inmediatamente después (<1hora) de una sección de la médula espinal completa a nivel torácico. (C) Las medidas de la magnitud de las respuestas de corta latencia de la señal rMUA de todos los animales agrupados. Las barras representan las medias y las barras de error las desviaciones estándar. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre condiciones adyacentes (ver texto) (D-E) Registros intracelulares representativo en la corteza de la garra trasera: (D) animal intacto y (E) después de lesión medular. Se muestra las respuestas a corrientes despolarizantes (izquierda), 20 segundos de registro alrededor de 10 estímulos consecutivos de garra delantera (centro) y una versión ampliada de 2 estímulos (derecha). La cabeza de flecha indica las entradas sinápticas. (F) Gran promedio de un histograma de tiempo peri-estímulo (PSTH) de todos los registros intracelulares y yuxtacelulares antes (gris oscuro) y después (gris claro) de lesión medular (SCI). El incremento de la respuesta de corta latencia representa una reorganización funcional independiente de estado de la corteza desaferentada (garra trasera) inmediatamente después de la lesión medular. (H) La reorganización en la corteza de la garra trasera (medida por el porcentaje de incremento de las respuesta rMUA) y la reorganización en la corteza de la garra delantera (medida por el porcentaje de incremento de la respuesta evocada de LFP) están correlacionados.

6. DISCUSIÓN

Esta tesis tiene como objetivo principal el estudio de los cambios fisiológicos en la corteza somatosensorial primaria inmediatamente después de una lesión medular completa, a nivel de T9-T10, en ratas anestesiadas. Para llevar a cabo este estudio se dividió el objetivo principal en dos objetivos específicos:

1) El primer objetivo específico se basó en el estudio de la actividad espontánea y evocada por estímulos eléctricos de la corteza somatosensorial primaria antes y después de una lesión medular completa a nivel torácico. De los experimentos realizados para alcanzar el primer objetivo obtuvimos dos resultados importantes:

- La corteza somatosensorial primaria cambia de estado inmediatamente después de una lesión medular.

- Las respuestas somatosensoriales evocadas en la región cortical intacta incrementan después de la lesión medular debido a la modulación dependiente del estado.

2) Tras obtener los resultados del primer objetivo, propusimos un segundo objetivo en el que se estudiaron los cambios corticales independientes del estado después de una lesión medular completa. De los experimentos realizados para alcanzar el segundo objetivo obtuvimos el siguiente resultado principal:

- Existe una componente independiente del estado que contribuye al incremento de las respuestas corticales somatosensoriales después de una lesión medular.

6.1. Cambios del estado cortical y de las respuestas evocadas en la corteza somatosensorial primaria

En nuestros experimentos, una sección torácica de la médula espinal produce inmediatamente una reorganización funcional de la corteza somatosensorial primaria en ratas anestesiadas. Nuestros resultados demuestran que existe un cambio de estado en la corteza somatosensorial primaria que consiste en el desarrollo de una actividad en onda lenta ($<1\text{Hz}$). Además, este cambio de actividad espontánea genera una modulación de las respuestas en la corteza intacta inmediatamente después de la lesión medular. Los cambios corticales que suceden de forma inmediata después de la lesión medular se observan también después de un bloqueo farmacológico de la conducción axonal a nivel espinal, mientras que no se observan en experimentos control en los cuales la médula permanece intacta durante todo el experimento. Por tanto la lesión medular afecta funcionalmente tanto a regiones intactas como desaferentadas del sistema somatosensorial.

6.1.1. Cambios en las respuestas corticales

Inmediatamente después de una lesión medular completa a nivel torácico, se observa un aumento de las respuestas evocadas en la zona cortical intacta (corteza correspondiente a la garra delantera) al estimular esa zona corporal. Algunos autores han realizado estudios de la corteza somatosensorial y motora después de lesión medular a largo plazo, usando diferentes técnicas de imagen para medir cambios fisiológicos: Hofstetter et al. (2003) utilizaron técnicas de imagen de resonancia magnética funcional (fMRI) para estudiar efectos de la contusión medular a nivel torácico en ratas; Endo et al. (2007) también utilizaron fMRI para estudiar la sección medular torácica y; Ghosh et al. (2010) utilizaron fMRI y la técnica de imagen de fluorescencia sensible a voltaje (VSD) para el estudio de sección torácica dorsal bilateral de la médula. En

concreto, Endo y colaboradores (2007), con el mismo modelo de lesión que utilizamos nosotros, encontraron un incremento de la señal fisiológica obtenida mediante fMRI (BOLD) en la corteza somatosensorial primaria en respuesta a la estimulación de la garra intacta. Los primeros datos se obtuvieron 3 días después de la lesión medular. Los autores remarcaban una expansión de la zona cortical que se activa tras la estimulación, de forma que la activación de la corteza de la garra delantera invade la corteza de la garra trasera. Pero en las imágenes que se muestran como resultado, se puede observar que 3 días después de la lesión también existe un incremento en la intensidad de la señal BOLD en la corteza de la garra delantera. Este incremento es consistente con el aumento en la respuesta cortical en la región intacta, que hemos descrito en nuestros resultados de forma más temprana.

En el trabajo de Ghosh y colaboradores (2010) también se describe, usando fMRI y VSD, una expansión de la corteza somatosensorial activada al estimular la extremidad delantera del animal una semana después de lesión medular. Pero se puede observar que no solo las respuestas en la corteza desaferentada sino también en la corteza intacta incrementan tras la lesión medular, lo cual de nuevo es consistente con nuestros resultados.

Las respuestas corticales evocadas por estímulos sensoriales obtenidas con diferentes técnicas, como BOLD en fMRI, VSD y LFP, aportan información similar y/o complementaria (Logothetis et al., 2001; Arthurs y Boniface, 2003; Petersen et al., 2003; Goloshevsky et al., 2008). Estos trabajos nos dan la base para poner en contexto más general nuestros resultados obtenidos con LFP y rMUA. En este sentido, nuestros datos no muestran directamente la mayor expansión cortical activada tras la lesión, pero sí se puede relacionar la mayor magnitud de respuesta con el incremento de la intensidad de activación que se observa en trabajos de otros autores (Ghosh et al., 2010; Endo et al., 2007). Un aspecto importante de nuestros resultados es que existen cambios fisiológicos en etapas más tempranas que las que se muestran en los estudios realizados

por Ghosh et al. (2010) y Endo et al. (2007). Proponemos que los cambios fisiológicos tempranos que nosotros observamos pueden ser el origen de los cambios funcionales y anatómicos descritos en los trabajos citados anteriormente.

Es importante matizar que los cambios en las respuestas corticales observadas después de una lesión medular ocurren sólo cuando el estímulo eléctrico es de alta intensidad (5mA). En nuestros experimentos hemos utilizado 2 intensidades diferentes basándonos en estudios que demuestran que se puede estimular tractos diferentes según la intensidad (Lilja et al., 2006; Yagüe et al., 2011). Los estímulos de baja intensidad (0.5mA) sólo activan el tracto de las columnas dorsales mientras que los estímulos de alta intensidad (5mA) activan tanto el tracto de las columnas dorsales como el tracto espinotalámico. Este abordaje nos permite determinar el nivel de reclutamiento necesario para observar cambios fisiológicos. En este contexto el reclutamiento de las diferentes vías somatosensoriales puede ayudar a entender una contradicción presente en la literatura: en los trabajos de Hofstetter et al. (2003), Endo et al. (2007) y Ghosh et al. (2010), utilizando estímulos de relativamente alta intensidad (>1mA; Lilja et al., 2006), se observó reorganización cortical a largo plazo; al contrario que en el estudio de Jain et al. (1995), donde utilizando estímulos táctiles (que se podrían relacionar con estímulos de intensidad menor de 1mA), no se observó reorganización cortical después de una sección de columnas dorsales. Es posible que la reorganización funcional observada en estos estudios necesite la activación de la vía espinotalámica o una entrada táctil masiva, que se corresponde con la activación simultánea de muchos campos receptores. Esta posibilidad explicaría que el estudio de campos receptores discretos no aporte resultados claros al respecto (Jain et al., 1995). En nuestro experimento, el uso de las dos intensidades nos permitió determinar que existe una necesidad de entradas masivas para poder observar efectos fisiológicos inmediatamente después de lesión medular.

6.1.2. Cambios en la actividad cortical espontánea

En la gran mayoría de los trabajos que estudian la reorganización de las respuestas corticales después de una desaferentación por lesiones periféricas o centrales - incluyendo los estudios de Endo et al. (2007) y Ghosh et al. (2010) - no se ha considerado el estado de la actividad espontánea como posible modulador de las respuestas. Con nuestro trabajo, mostramos que inmediatamente después de una sección torácica de la médula, la actividad cortical espontánea pasa a ser más lenta, y en general, más silente, entrando en un estado de onda lenta similar al estado observado durante el sueño de onda lenta (Steriade et al., 1993; Vyazovskiy et al., 2009; Crunelli y Hughes, 2010) y en niveles profundos de anestesia (Friedberg et al. 1999; Erchova et al., 2002).

La explicación más intuitiva para estos cambios inmediatos en la actividad cortical espontánea es que la sección medular probablemente disminuye las entradas tónicas de origen periférico a las estructuras somatosensoriales supraespinales, produciendo un efecto cortical que se asemeja a una desaferentación talamocortical directa (Rigas y Castro-Alamancos, 2007; Hirata y Castro-Alamancos, 2010). A primera vista, se podría esperar que el enlentecimiento/silenciación ocurriera sólo en la corteza desaferentada de la garra trasera, sin embargo, sucede también en la corteza intacta de la garra delantera. En ratas, las regiones de corteza pertenecientes a la garra delantera y trasera están funcionalmente conectadas (Moxon et al., 2008; Ghosh et al., 2009, 2010). Además la alternancia fisiológica entre estados activados y silentes, que caracterizan la actividad de onda lenta, ocurre sincrónicamente en grandes regiones corticales (Fox y Armstrong-James, 1986; Steriade, 2006; Mohajerani et al., 2010). Por tanto, si una región (por ejemplo la corteza de la garra trasera) reduce su actividad, es probable que las regiones adyacentes (por ejemplo la corteza de la garra delantera) también disminuyan su actividad debido a mecanismos fisiológicos de sincronización, como excitaciones-inhibiciones recíprocas corticales (Amzica y Steriade, 1995).

También podemos considerar que la sección medular afecte directamente a la actividad de las estructuras del tronco del encéfalo, mesencéfalo y de los núcleos talámicos, que reciben de cualquiera de los dos tractos principales (vía lemniscal y espinotalámica) (Moruzzi y Magoun, 1949; Lindvall et al., 1974; Hobson et al., 1975; Foote et al., 1980; Aston-Jones y Bloom, 1981a,b; Satoh y Fibiger, 1986; Fox y Armstrong-James, 1986; Hallanger et al., 1987; Steriade et al., 1990; Aguilar y Castro-Alamancos, 2005; Ren et al., 2009). Todos estos núcleos contribuyen a la regulación de los estados corticales y por tanto al estado de sincronía entre diferentes regiones corticales. Por tanto, la lesión medular podría afectar a estas estructuras subcorticales y finalmente a la actividad cortical.

Una actividad cortical más lenta ha sido observada previamente con registros de EEG en pacientes con lesión medular comparado con personas sin lesión (Tran et al., 2004; Boord et al., 2008; Wydenkeller et al., 2009). También en humanos, se ha observado que tanto la actividad cortical más lenta (Wydenkeller et al., 2009) como la reorganización cortical a largo plazo después de lesión medular (Wrigley et al., 2009) correlacionan con la aparición del dolor neuropático. Desde una perspectiva translacional, esto sugiere - con todos los límites que supone comparar datos de pacientes despiertos con ratas anestesiadas - que el enlentecimiento inmediato de la actividad cortical espontánea después de una lesión medular puede tener un papel en la reorganización cortical a largo plazo y en el desarrollo del dolor neuropático.

6.1.3. Relación entre la actividad cortical espontánea y las respuestas evocadas

Las respuestas corticales a estímulos sensoriales dependen en gran parte del estado de la actividad espontánea en las redes corticales (Arieli et al., 1996; Wörgötter et al., 1998; Tsodyks et al., 1999; Kisley y Gerstein, 1999; Azouz y Gray, 1999; Kenet et al., 2003; Lakatos et al., 2008). Se ha descrito que en el sistema somatosensorial de las ratas, los estímulos periféricos generan una

respuesta cortical diferente según el estado en que se encuentre la corteza somatosensorial (Castro-Alamancos, 2004). Centrados en la actividad de onda lenta, las respuestas corticales son de mayor amplitud cuando el estímulo sucede en un estado cortical silente en comparación con las respuestas cuando el estímulo sucede en un estado activado (Petersen et al., 2003; Sachdev et al., 2004). En nuestros resultados podemos observar este fenómeno. De este modo, el cambio de estado cortical observado tras la lesión medular puede explicar en parte el aumento de las respuestas evocadas, ya que los estímulos aplicados en la garra delantera después de una sección medular tienen mayor probabilidad de suceder durante un estado silente, evocando una respuesta cortical más grande con respecto a la situación control. Como se ha explicado anteriormente el incremento de respuestas corticales sólo fue observado por la aplicación de estímulos de alta intensidad, por lo tanto consideramos que es necesario el reclutamiento masivo de aferencias sensoriales para poder observar este fenómeno.

Cuando un estímulos sucede en un estado cortical silente, además de generar una respuesta de mayor amplitud, aparece con gran probabilidad un estado activado asociado a dicho estímulo (Hasenstaub et al., 2007; Reig y Sanchez-Vives, 2007). Los estados activados tienen la propiedad de propagarse a otras regiones corticales (Rigas y Castro-Alamancos, 2004; Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Massimini et al., 2004) de tal manera que cuando son generados por estímulos de la garra intacta del animal se propagan de la corteza intacta a la corteza desaferentada. En nuestros datos, el cambio de estado inmediatamente después de la lesión medular genera un aumento de la probabilidad de que los estímulos originen estados activados asociados a la respuesta. Los estados activados asociados a la estimulación periférica que se originan después de la lesión en la corteza intacta se propagarán hacia la corteza desaferentada, lo que se observaría como una invasión de actividad o una expansión de volumen cortical activado por el estímulo. Este proceso podría

explicar aquellos estudios donde se observa un incremento del área cortical activada, por estímulos de la garra intacta, pocos días después de la lesión (Endo et al., 2007; Ghosh et al., 2010).

En nuestros resultados encontramos que tanto el incremento de las respuestas evocadas en la corteza intacta como los estados activados asociados al estímulo son fenómenos dependientes del estado. El mecanismo que subyace a estos fenómenos es esencialmente el mismo por el cual las respuestas somatosensoriales de la corteza aumentan en estados de quiescencia comparado con estados de atención en animales despiertos (Castro-Alamancos, 2004). Nuestros resultados van más allá de la idea clásica del desenmascaramiento identificado en las lesiones periféricas y centrales (Faggin et al., 1997; Hains et al., 2005; Endo et al., 2007; Hirata et al., 2009; Dostrovsky et al., 1976; Leong y Tan, 1987; Gwak et al., 2008; Gwak et al., 2012; Kelahan y Doetsch, 1984; Turnbull y Rasmusson, 1990; Carlord y Tweedale, 1988, 1991a; Wall y Cusick, 1984; Cusick et al., 1990; Byrne y Calford, 1991; Doetsch et al., 1996), revelando que estos cambios en el estado del cerebro pueden jugar un papel crítico en los mecanismos tempranos de la reorganización cortical después de una desaferentación y en el origen de la plasticidad a largo plazo.

6.1.4. Bloqueo farmacológico de la médula: una desaferentación sensorial reversible

Con el abordaje experimental del bloqueo farmacológico de la médula espinal, se pretendió realizar una desaferentación sensorial sin daño físico, y con la ventaja de ser reversible, en la misma zona torácica donde se realizaba la lesión medular. Es importante destacar que este experimento de bloqueo farmacológico permitía lavar el efecto del bloqueante en la médula espinal recuperando así la actividad original en la corteza somatosensorial. En estos experimentos de bloqueo farmacológico obtuvimos tanto el cambio de estado de actividad cortical, como el aumento de la magnitud de las respuestas

evocadas. Sin embargo, dichos cambios no se observaron en los experimentos control en los que se llevaba a cabo la extracción de la vertebra en el mismo nivel torácico, pero no se realizaba lesión medular. Esto significa que los resultados obtenidos en los experimentos de lesión medular son debidos a la masiva desaferentación producida por la lesión, mientras que es muy poco probable que sean debidos a la axotomía de las células eferentes corticoespinales (Hains et al., 2003; Lee et al., 2004; Jurkiewicz et al., 2006), o a reacciones sistémicas inespecíficas producidas por la lesión o al protocolo experimental.

Nuestros resultados muestran que la desaferentación genera actividad cortical de onda lenta. Esta actividad tiene origen localizado en la corteza cerebral pero su presencia es regulada por diferentes estructuras subcorticales (Fox y Armstrong-James, 1986; Manjarrez et al., 2002; Crunelli y Hughes, 2010). Nuestros resultados apoyan la idea de que la actividad de la corteza cerebral depende en gran parte de las aferencias periféricas y espinales (Manjarrez et al., 2002). Finalmente, en un estudio reciente se observa que durante el sueño después de un periodo natural de onda lenta se facilita la plasticidad cortical (Chauvette et al., 2012). Por tanto, la onda lenta generada tras lesión podría facilitar los procesos de plasticidad que llevan a la reorganización cortical a largo plazo (Aton et al., 2009).

6.1.5. *Descenso en los requerimientos de anestesia en animales con lesión aguda: implicaciones clínicas*

Como mostramos en el primer resultado principal de esta tesis, la lesión medular genera un cambio en el estado cortical, pasando de un estado activado a un estado de onda lenta. La actividad en onda lenta se genera de forma natural durante el sueño y se puede regular según el nivel de anestesia como se indica en los estudios de Friedberg et al. (1999) y Erchova et al. (2002). Este estado de onda lenta refleja un estado de anestesia más profundo, indicando

que después de la lesión medular el animal podría tener un menor requerimiento de anestesia. Por tanto, decidimos realizar una comparación de los experimentos control con los animales lesionados del primer objetivo, para así cuantificar la cantidad de anestesia suministrada en cada caso. Con este estudio hemos confirmado que los requerimientos de anestesia fueron menores después de lesión medular.

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos sedativos del bloqueo farmacológico de la médula espinal en pacientes (Tverskoy et al. 1994; Tverskoy et al. 1996; Ben-David et al., 1995; Inagaki et al., 1994; Gentili et al., 1998), demostrando que tras el uso de diferentes bloqueantes farmacológicos en la médula se necesita una menor dosis de anestesia. Estos resultados fueron además confirmados con estudios placebo de doble ciego, que corroboraron los efectos sedativos de anestesia epidural y anestesia con lidocaína espinal (Hodgson y Liu, 2001; Hodgson et al., 1999; Pollock et al., 2000).

La mayoría de los estudios clínicos anteriormente mencionados sugerían que los efectos sedativos de la anestesia espinal fueron probablemente debidos a desaferentación sensorial. Esta idea fue confirmada por estudios con animales (Antognini et al., 2003; Antognini et al., 2000; Antognini et al., 2003; Antognini et al., 2001; Antognini et al., 2000; Eappen y Kissin, 1998). En particular, en una serie de trabajos en cabras, Antognini et al. (2000, 2001, 2003) mostraron que el bloqueo farmacológico de la médula espinal deprime la acción activadora de la formación reticular sobre el EEG cortical. Trabajos realizados en humanos, sobre el efecto de la epidural en los potenciales evocados auditivos en el tronco del encéfalo, muestran resultados similares (Doufas et al., 2004). Nuestros datos refuerzan la hipótesis de la desaferentación y proporcionan una fuerte evidencia de que los anestésicos de la médula espinal pueden directamente afectar al tronco del encéfalo y por tanto afectar a la actividad de las estructuras superiores.

La otra posibilidad para explicar los efectos sedativos de la anestesia espinal es que el efecto de dicho anestésico se deba a la difusión rostral. Sin embargo en nuestros resultados mostramos que cuando realizamos el bloqueo farmacológico de la médula espinal no existe una difusión de dicho bloqueante, ya que la región cortical intacta continúa respondiendo ante su estímulo eléctrico periférico, mientras que la zona cortical desaferentada no presenta respuesta alguna a su estimulación periférica. Sugerimos que la desaferentación somatosensorial a nivel de la médula espinal, independientemente de su origen, disminuye el nivel de actividad del cerebro.

El mecanismo más probable por el cual la lesión medular puede disminuir los requerimientos de anestesia es por una depresión de sistemas de activación, no específicos, en el tronco del encéfalo (noradrenalina, acetilcolina, norepinefrina, serotonina, etc.). Es decir, la lesión medular puede afectar la actividad de la formación reticular (Peterson et al., 1976; Faingold y Stittsworth, 1980), del locus ceruleus (Cedarbaum y Aghajanian, 1978; Foote et al., 1980; Aston-Jones y Bloom, 1981a y b; Elam et al., 1986; Hirata y Aston-Jones, 1994; Aston-Jones et al. 1982), del núcleo rafe (Moolenaar et al., 1976; Springfield y Moolenaar, 1983; Waterhouse et al., 2004) y otros núcleos del tronco del encéfalo. Además se pueden ver afectados núcleos talámicos reguladores de la actividad cortical (núcleos mediales e intralaminares). De acuerdo con esta interpretación, el cerebro aislado, in vivo, muestra un mayor ritmo de EEG de sueño en ausencia de anestésicos generales (Steriade et al., 1993) ya que carece de los núcleos del tronco del encéfalo encargados de la neuromodulación. Es importante destacar que la depresión de sistemas de activación no específicos en el tronco del encéfalo después de lesión medular es independiente de los mecanismos de acción del uretano, el cual inespecíficamente incrementa la función de receptores inhibitorios mientras que disminuye la función de los receptores excitatorios (Steriade et al., 1993; Sceniak and Maciver, 2006). Un factor que confirmó que los cambios observados en nuestros datos no se debían

al uretano fue la recuperación de la actividad cortical a un estado de anestesia ligera una vez que se recuperó la conducción axonal medular.

Estos resultados podrían tener implicaciones clínicas importantes. En particular, esperamos que los pacientes con lesión medular - y más en general, pacientes con un importante grado de desaferentación sensorial - requieran menos anestesia en comparación con pacientes con sistema somatosensorial intacto. Esta predicción fue en parte verificada por Yoo et al, en 2006, quien mostró que los requerimientos de anestesia disminuían en 20-39% en pacientes con lesión medular que sufrían una cirugía por debajo del nivel de lesión. El mismo grupo, sin embargo, informaba que no existen cambios en los requerimientos de anestesia en pacientes con lesiones medulares agudas que sufrían cirugías en el nivel de la lesión (Yoo et al., 2006). Estas aparentes diferencias pueden posiblemente ser explicadas por mecanismos compensatorios de corto y largo plazo que ocurren en el cerebro en respuesta a la desaferentación.

La desaferentación somatosensorial puede tener también un papel en el complejo espectro de disturbios del sueño observado después de lesión medular (Adey et al., 1968; Bonekat et al., 1990; Esteves et al., 2007; Scheer et al., 2006). Nuestros datos se limitan a las primeras horas después de la lesión medular en un modelo animal de rata anestesiada con uretano, pero es un paso a tener en cuenta a la hora de pensar en pacientes.

6.2. Cambios en las respuestas corticales después de una lesión medular: mecanismos dependientes e independientes del estado

El primer resultado principal de esta tesis es que la lesión medular genera un cambio de estado en la corteza somatosensorial, que además modula las

respuestas corticales por encima del nivel de lesión. Sin embargo, nos planteamos la existencia de mecanismos de plasticidad independientes del estado cortical. Con ese planteamiento revisamos exhaustivamente los datos ya obtenidos, buscando diferencias en la relación entre las respuestas evocadas y actividad previa al estímulo. Observamos que un mismo rango en la señal rMUA, que se corresponde con el DOWN, presentaba dos magnitudes de respuesta diferente, lo cual sugería la existencia de mecanismos independientes del estado. Por lo tanto nos propusimos un segundo estudio en el que se pudiera controlar de forma exhaustiva el estado cortical a lo largo de todo el experimento, con el fin de evitar un cambio de estado antes y después de lesión medular. De este estudio se obtuvo el segundo resultado principal de este trabajo: la lesión medular completa, a nivel torácico, también genera una reorganización funcional inmediata en la corteza somatosensorial primaria de ratas anestesiadas que es independiente del estado cortical existente. Una hora después de la lesión medular, observamos que tanto la corteza cerebral intacta perteneciente a la garra delantera como la corteza cerebral desaferentada perteneciente a la garra trasera responden más que en situación control al estímulo de la garra delantera (por encima del nivel de la lesión). Este aumento de la amplitud de las respuestas en la corteza de la garra delantera y trasera mostró una correlación, lo que sugirió que el incremento de las respuestas en dos cortezas diferentes puede dar lugar a una reorganización cortical global después de lesión medular.

6.2.1. Reorganización fisiológica de la corteza cerebral intacta (garra delantera) después de una lesión medular torácica

El planteamiento inicial de esta segunda parte del trabajo requería poder controlar el estado de la actividad cortical con el fin de poner de manifiesto fenómenos dependientes e independientes del estado de la corteza cerebral. Se ha descrito que la dosis de anestesia, en nuestro caso uretano, afecta a los

ritmos corticales (Erchova et al., 2002): dosis mayores de anestesia inducen el paso de un estado cortical rápido a uno más lento. Este mismo fenómeno de modulación de estado por dosis de anestesia se ha estudiado a nivel talámico y con diferentes anestésicos (Friedberg et al., 1999; Rivadulla et al., 2003; Aguilar y Castro-Alamacos, 2005). Estos trabajos nos permiten utilizar la anestesia como una herramienta para controlar el estado en el que se encuentra la corteza somatosensorial, mediante la aplicación de diferentes dosis de anestesia al animal a lo largo de todo el experimento.

Como se ha demostrado, una lesión medular completa produce un cambio en la actividad cortical hacia un estado de onda lenta, así que en el experimento que se realizó en la segunda parte de esta tesis, se utilizó el nivel de anestesia para situar al animal en el mismo estado de actividad cortical antes y después de lesión. Este abordaje, nos permitió discernir la contribución de los mecanismos dependientes e independientes de estado sobre el aumento de las respuestas corticales inmediatamente después de lesión medular. Aunque no podemos excluir que puedan existir cambios más sutiles en el estado local de la corteza somatosensorial, varias observaciones complementarias, sobre nuestros datos, soportan la existencia de reorganización funcional a nivel cortical independiente del estado (una reorganización que no se basa en un cambio en el estado global del cerebro):

- La actividad de la corteza cerebral se encontraba en un estado de onda lenta tanto antes como después de la lesión medular, de forma que el nivel global de la actividad cortical espontánea no cambió (la actividad cortical espontánea fue cuantificada con diferentes medidas, basadas en el espectro (frecuencia principal), en la distribución de amplitud de la actividad multi-unitaria rectificada (media y moda), verificando la distribución bimodal de la actividad cortical).

- El incremento de las respuestas corticales dependiente del estado - que se produjo al suministrar una dosis suplementaria de anestesia - se asoció con

una disminución de la inhibición después de las respuestas, mientras que el incremento de las respuestas corticales independiente del estado – que se produjo con la lesión medular – se asoció con una disminución de la inhibición después de las respuestas.

- En el análisis de los estímulos de forma individual, se observó el aumento de las respuestas después de la lesión tanto si los estímulos sucedían en estados corticales silentes como en estados corticales activados. Los estados silentes son apropiados para aislar la reorganización cortical independiente del estado, ya que no existe disparo neuronal durante dicho intervalo de tiempo (Ruiz-Mejias et al., 2011; Puig et al., 2008).

Con la intención de acotar la extensión de corteza somatosensorial cuyas respuestas se modulaban por una lesión medular, se realizaron experimentos en los que se obtuvieron diferentes registros de la región de extremidad delantera y de la región de vibrisas. El aumento de la magnitud de las respuestas corticales en la región de la garra delantera por estímulos eléctricos de su correspondiente extremidad fue consistentemente observado en diferentes coordenadas de dicha corteza de la garra intacta. Sin embargo, cuando cambiamos la zona cortical de registro a la zona correspondiente a las vibrisas, no apreciamos ese cambio en la respuesta cortical al estímulo periférico en las vibrisas. Esto se puede explicar por un lado porque la corteza de las vibrisas es una corteza intacta que, a nivel espacial en coordenadas corticales, se encuentra a una distancia mayor de la corteza de la garra trasera en comparación con la corteza de la garra delantera. Por otro lado, durante el desarrollo, la región trigeminal (que recibe la información de las vibrisas) aparece representada en la corteza antes que las regiones espinales correspondiente a las extremidades y el tronco del animal (Seelke et., 2012). Esto podría explicar que exista una conectividad mayor entre garra delantera y trasera comparada con la conectividad entre la garra trasera y vibrisas. Es interesante notar que los trabajos de reorganización cortical después de lesión

medular, tanto en modelos animales como en humanos (Endo et al., 2007; Wrigley et al., 2009) muestran que el fenómeno de invasión de la región cortical desaferentada sucede desde la región cortical intacta más próxima. Así cuando el daño es en miembros inferiores la invasión sucede desde la región cortical de los miembros superiores, pero si el daño es en miembros superiores, la invasión viene desde regiones corticales rostrales (Jain et al., 1997; Jain et al., 2008, Borsook et al., 1998). Estos resultados sugieren que la reorganización cortical se encuentra limitada anatómicamente a regiones próximas a la región desaferentada.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo sugieren que tanto los mecanismos dependientes como independiente del estado puede contribuir a la reorganización funcional en la corteza de la garra delantera intacta inmediatamente después de lesión medular. Porque la actividad en onda lenta- la cual caracteriza a la reorganización dependiente de estado- induce plasticidad a largo plazo (Chauvette et al., 2012), esta combinación de mecanismos dependientes e independientes de estado puede ser crítico para entender la reorganización cortical a largo plazo después de lesión medular.

6.2.2. Reorganización fisiológica de la corteza cerebral desaferentada (garra trasera) después de una lesión medular torácica

Como se ha mostrado en la primera parte de esta tesis, el estímulo de la garra delantera genera 2 tipos de respuestas en la corteza de la garra trasera: (1) una respuesta de corta latencia (<50ms), que corresponde a una respuesta somatosensorial clásica (Moxon et al., 2008), y (2) una activación de larga latencia (>50ms), que corresponde a la generación de estados activados asociados a los estímulos en la corteza de la garra delantera que se propagan a la corteza de la garra trasera.

En el estudio que se realizó para alcanzar el primer objetivo, se analizó la probabilidad de aparición de los dos tipos de respuestas antes y después de

lesión medular. Los resultados mostraron un incremento solo en las activaciones de larga latencia, ligado al cambio de estado que se produjo por lesión medular, ya que las activaciones de larga latencia solo tienen lugar durante estados corticales de onda lenta. Debemos tener en cuenta que el estímulo periférico fue aplicado en la garra delantera, por lo que consideramos que el estado activado se origina asociado al estímulo en la corteza intacta y se transmite a la corteza desaferentada. Se ha descrito que los estados activados que se originan asociados a un estímulo periférico en una zona cortical se pueden propagar a otras áreas de la corteza (Rigas y Castro-Alamancos, 2004; Sanchez-Vives y McCormick, 2000; Massimini et al., 2004), por lo cual es posible que este tipo de actividad forme parte de las señales obtenidas en trabajos que utilizan técnicas como resonancia magnética funcional, en la que se pierde la precisión temporal, y observan las activaciones masivas en regiones del cerebro que han quedado desaferentadas (Hofstetter et al., 2003; Endo et al., 2007; Ghosh et al., 2010).

En el estudio que se llevó a cabo para alcanzar el segundo objetivo - cambios corticales independientes del estado - se cuantificó la magnitud de las respuestas de corta latencia, ya que al no cambiar la probabilidad de ser generadas cuando cambió el estado, mostraron independencia del estado. Los resultados mostraron que existe un incremento en la magnitud de la respuesta de corta latencia después de la lesión exclusivamente por mecanismos independientes del estado. Además de una mayor magnitud de la señal rMUA, con los datos obtenidos mediante registros yuxtacelulares e intracelulares pudimos mostrar que las neuronas individuales registradas en la región de la garra trasera tuvieron una mayor probabilidad de producir potenciales de acción (en respuesta a la extremidad anterior) después de lesión medular. Asimismo, los potenciales sinápticos obtenidos de los registros intracelulares mostraron un incremento significativo en el grupo de neuronas que se registró después de la lesión medular. Estos resultados pueden dar una explicación

electrofisiológica inmediata a nivel celular de los cambios más tardíos observados a nivel poblacional – con técnicas de fMRI y VSD – en la regiones corticales desaferentadas por lesiones medular (Endo et al., 2007; Ghosh et al., 2009; 2010). Un posible siguiente paso será el estudio de la dinámica espacio-temporal de la activación cortical inmediatamente después de lesión y así realizar una comparación con estudios realizados en situación control (Morales-Botello et al., 2012)

6.2.3. Posibles mecanismos de la reorganización cortical independiente del estado.

Con nuestros resultados se muestra que el estado cortical juega un papel importante en la reorganización funcional después de lesión medular, así como la existencia de una reorganización que es independiente del estado. Existen varios mecanismos, no excluyentes entre ellos, que pueden contribuir a una reorganización cortical independiente del estado después de una desaferentación sensorial: el crecimiento de nuevas conexiones debido a la ramificación axonal (Darian-Smith y Gilber, 1994), el desenmascaramiento de sinapsis latentes debido a la reducción de inhibiciones intracorticales (Jacob y Donoghue, 1991; Levy et al., 2002) o cambios en las propiedades intrínsecas neuronales.

Aunque recientes estudios muestran que puede existir una ramificación axonal en la corteza desaferentada pocas horas después de una lesión de retina en monos (Yamahachi et al., 2009) o después de la eliminación de vibras en ratas (Marik et al., 2010), el marco de tiempo en el que se obtienen nuestros resultados sobre la reorganización funcional es un tiempo demasiado corto para que se lleve a cabo una ramificación axonal. Debemos tener en cuenta que nuestro modelo experimental y resultados hacen referencia no solo a la región cortical desaferentada, sino también a la región intacta, por lo que parece improbable un cambio de conexiones inmediato en ambas regiones corticales.

El mecanismo de desenmascaramiento de sinapsis excitadoras latentes, entendido como un cambio en las inhibiciones locales (Jacob y Donoghue, 1991; Levy et al., 2002), podría explicar el incremento de las respuestas tanto de potencial de campo como de la actividad multiunitaria rectificada. Los potenciales somatosensoriales registrados engloban tanto las oscilaciones del voltaje del potencial de membrana, como las entradas sinápticas y los potenciales de acción de la población neuronal que responde al estímulo. El aumento de la respuesta LFP en la región cortical intacta sugiere el incremento de alguno de los 3 componentes que lo constituyen, o la suma de todos ellos. El incremento de la respuesta del rMUA, muestra un aumento de la probabilidad de disparo neuronal, lo cual referido a la corteza desaferentada podría estar ligado a reducción de inhibiciones locales que facilitarían las respuestas. Asimismo, un proceso de reducción de inhibiciones locales podría suceder en la región intacta.

Los datos de los registros intracelulares obtenidos en la región cortical desaferentada demuestran que además del aumento de la probabilidad de disparo de las neuronas tras lesión también existe un incremento de la magnitud en el promedio de las entradas sinápticas. En este caso, nuestros datos solo se refieren a la región desaferentada y no podemos saber si el mismo proceso sucede en la región intacta. Todo ello sugiere que el mecanismo de desenmascaramiento de sinapsis por pérdida de inhibiciones locales podría ser un factor importante en los cambios inmediatos observados después de lesión.

El desenmascaramiento debido a pérdida de inhibiciones se puede deber a dos tipos de inhibiciones: inhibición tónica intracortical e inhibición fásica que aparece asociada a un estímulo. El caso de la inhibición tónica se descarta debido a que el aumento de las respuestas corticales después de lesión medular se observa no solo en los estados activados, en los que hay inhibición tónica intracortical, sino también en los estados silentes, en los que no hay ningún tipo de actividad intracortical (Steriade et al., 1994; Luczak et al., 2007; Puig et

al.2008). El caso de la inhibición fásica es más complejo. Según nuestros datos la inhibición asociada al estímulo - medida como duración de la inhibición después de la respuesta en la corteza intacta - disminuye cuando se cambia el estado cortical de rápido a lento en animales intactos, mientras que aumenta después de la lesión medular, sin existir cambio de estado cortical. Pero el aumento de las respuestas corticales después de lesión medular se podría todavía explicar como un cambio en la relación excitación/inhibición. En un estudio reciente de Keck y colaboradores (2011), se observó una reducción de las espinas dendríticas y botones axonales de las interneuronas en la corteza desaferentada, y en un menor grado en la corteza adyacente, 6 horas después de una lesión en la retina de ratón. También se ha demostrado la pérdida de espinas de forma heterogénea 3 días después de lesión medular en ratón (Ghosh et al., 2011). Por tanto proponemos que los cambios estructurales sean la consecuencia, más que la causa, de la reorganización funcional en la corteza somatosensorial después de lesión medular.

El aumento de las respuestas corticales puede ser debido también a un cambio de las propiedades intrínsecas de las neuronas, que podría suceder por variaciones del tono de neuromodulación desde estructuras subcorticales a la corteza cerebral (Moruzzi y Magoun, 1949; Lindvall et al., 1974; Hobson et al., 1975; Foote et al., 1980; Aston-Jones y Bloom, 1981a,b; Satoh y Fibiger, 1986; Fox y Armstrong-James, 1986; Hallanger et al., 1987; Steriade et al., 1990; Aguilar y Castro-Alamancos, 2005; Ren et al., 2009). Hemos demostrado que una lesión medular completa cambia el estado de la corteza cerebral, y en ese sentido hemos propuesto que la falta de aferencias sensoriales hacia las estructuras neuromoduladoras localizadas en el tronco del encéfalo, mesencéfalo y tálamo pueden originar el cambio de estado (lo cual se ha discutido en el apartado "*Cambios en la actividad cortical espontánea*" (6.1.2.)). Los efectos que producen los neuromoduladores sobre las neuronas corticales consisten en modular las propiedades intrínsecas, como el nivel de polarización

y la resistencia de entrada (Hirata y Castro-Alamancos, 2011; Favero et al., 2012). Los cambios en las propiedades intrínsecas pueden generar aumento de respuestas al mismo estímulo, por ejemplo, por una bajada del umbral para generar potenciales de acción o por un aumento de la resistencia de entrada neuronal. Estos dos ejemplos, muestran otra forma de alterar la eficacia sináptica, no necesariamente relacionada con un desenmascaramiento por pérdida de inhibición. Los resultados muestran que ambas regiones corticales (corteza intacta y corteza desaferentada) cambian en el mismo sentido (aumentan las respuestas), lo que sugiere que la neuromodulación al actuar de forma general podría alterar las propiedades intrínsecas de las neuronas de igual forma en ambas regiones de la corteza somatosensorial.

Finalmente, no podemos excluir que al menos parte de la reorganización que nosotros observamos a nivel cortical pueda ser el reflejo de un cambio o reorganización a nivel subcortical. El hecho de que nuestros resultados fueron significativos solamente con estímulos de alta intensidad - que activan tanto la vía de las columnas dorsales y como el tracto espinotalámico (Lilja et al., 2006; Yague et al., 2011) - sugiere que la interacción subcortical entre la vía lemniscal y paralemniscal (Masri et al., 2009; Quiron et al., 2010) podría jugar un papel importante en nuestro modelo experimental (Endo et al., 2007). En principio, la reorganización subcortical podría ocurrir a nivel talámico (Faggin et al., 1997; Hains et al., 2005; Endo et al., 2007; Hirata et al., 2009), a nivel del tronco del encéfalo (Dostrovsky et al., 1976; Leong y Tan, 1987; Faggin et al., 1997; Hirata et al., 2009), o incluso a nivel de la medula espinal (Gwak et al., 2008; Gwak et al., 2012; Redondo-Castro et al., 2013). Independientemente del mecanismo cortical/subcortical exacto, el aumento de las respuestas corticales descrito en la segunda parte de esta tesis representa la reorganización global independiente del estado del sistema somatosensorial inmediatamente después de una lesión medular torácica. Tanto los factores dependientes como los independientes del estado que se han expuesto en esta tesis pueden contribuir en distinta medida a

los procesos de reorganización cortical inmediata y a largo plazo que suceden después de una lesión medular.

6.2.4. Significancia fisiopatológica

Se han realizado muchos estudios sobre reorganización del sistema somatosensorial después de una lesión, periférica o central, donde se asumía que la región intacta no sufría cambios debido a que no debería estar afectada por la desaferentación. Sin embargo, con nuestros datos se deja ver claramente un cambio a nivel cortical en la región intacta después de lesión medular. A continuación vamos a detallar ideas de ciertos trabajos que apoyan la relevancia fisiopatológica, a largo plazo, de la reorganización inmediata de la corteza intacta (corteza de la garra delantera): (1) en los datos presentados por Endo et al. (2007) y Ghosh et al. (2010) se puede observar - aunque no esté explícitamente descrito por los autores - que existe una reorganización cortical del área perteneciente a la garra intacta a largo plazo después de lesión medular; (2) en el trabajo de Curt et al. (2002) se observó un aumento del volumen de activación, con respecto al control, en la corteza motora intacta cuando pacientes parapléjicos movían su miembro superior no afectado por la lesión; (3) tanto en personas como en modelos animales se puede desarrollar hipersensibilidad y dolor por encima del nivel de la lesión, como pusieron de manifiesto Carlton et al. (2009); (4) en los trabajos de Kao et al. (2009 y 2010) se muestra que la región cortical intacta puede generar plasticidad inducida por ejercicio, llevando a una mayor reorganización de la región cortical desaferentada en ratas lesionadas en periodo neonatal. Nuestros datos sugieren que inmediatamente después de una lesión torácica completa existe una correlación entre la reorganización de la corteza de la garra intacta y la garra desaferentada. Esto puede ser importante para lograr entender de una mejor forma los mecanismos tempranos que dirigen la reorganización cortical a largo plazo, y así desarrollar intervenciones que puedan manejar la posible

consecuencia patológica de cada reorganización y por tanto optimizar la recuperación después de lesión medular (Engineer et al., 2011).

En conclusión de esta segunda parte, la reorganización cortical independiente del estado abarca tanto la corteza somatosensorial desaferentada como la intacta inmediatamente después de lesión medular a nivel torácico. Este fenómeno puede iniciar la cascada de mecanismos que dirigen la reorganización cortical a largo plazo tras la desaferentación sensorial.

7. CONCLUSIONES

- La lesión medular produce un cambio inmediato en el estado de la corteza somatosensorial primaria, que a su vez produce un cambio en la respuesta evocadas en la corteza intacta (garra delantera).

- También existe un mecanismo independiente del estado que contribuye al cambio de las respuestas evocadas en la corteza intacta.

- La respuestas evocadas en la corteza desaferentada (garra trasera) por estímulos periféricos de la garra delantera, constan de dos componentes, ambas afectadas por la lesión medular: respuestas de corta latencia (<50ms), independientes del estado cortical, y activaciones de larga latencia (>50ms), dependientes del estado cortical.

- Los animales con lesión medular tienen un requerimiento de anestesia menor que los animales intactos.

8. REFERENCIAS

Abeles M (1991) Neuronal circuits of the cerebral cortex. (Cambridge University Press, ed)

Adey WR, Bors E, Porter RW (1968) EEG sleep patterns after high cervical lesions in man. Archives of neurology 19:377–383

Agmon A, Connors BW (1992) Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 12:319–329

Aguilar J, Morales-Botello ML, Foffani G (2008) Tactile responses of hindpaw, forepaw and whisker neurons in the thalamic ventrobasal complex of anesthetized rats. The European journal of neuroscience 27:378–387

Aguilar JR, Castro-Alamancos MA (2005) Spatiotemporal gating of sensory inputs in thalamus during quiescent and activated states. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:10990–11002

Amzica F, Steriade M (1995) Disconnection of intracortical synaptic linkages disrupts synchronization of a slow oscillation. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 15:4658–4677

Antal M (1984) Termination areas of corticobulbar and corticospinal fibres in the rat. Journal für Hirnforschung 25:647–659

Antognini JF, Atherley R, Carstens E (2003a) Isoflurane action in spinal cord indirectly depresses cortical activity associated with electrical stimulation of the reticular formation. Anesthesia and analgesia 96:999–1003

Antognini JF, Carstens E, Sudo M, Sudo S (2000a) Isoflurane depresses electroencephalographic and medial thalamic responses to noxious stimulation via an indirect spinal action. Anesthesia and analgesia 91:1282–1288

Antognini JF, Jinks SL, Atherley R, Clayton C, Carstens E (2003b) Spinal anaesthesia indirectly depresses cortical activity associated with electrical stimulation of the reticular formation. *British journal of anaesthesia* 91:233–238

Antognini JF, Saadi J, Wang XW, Carstens E, Piercy M (2001) Propofol action in both spinal cord and brain blunts electroencephalographic responses to noxious stimulation in goats. *Sleep* 24:26–31

Antognini JF, Wang XW, Carstens E (2000b) Isoflurane action in the spinal cord blunts electroencephalographic and thalamic-reticular formation responses to noxious stimulation in goats. *Anesthesiology* 92:559–566

Antonetty CM, Webster KE (1975) The organisation of the spinotectal projection. An experimental study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 163:449–465

Arcelli P, Frassoni C, Regondi MC, De Biasi S, Spreafico R (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity? *Brain research bulletin* 42:27–37

Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A (1996) Dynamics of ongoing activity: explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science (New York, NY)* 273:1868–1871

Armand J (1982) The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals. *Progress in brain research* 57:329–360

Arthurs OJ, Boniface SJ (2003) What aspect of the fMRI BOLD signal best reflects the underlying electrophysiology in human somatosensory cortex? *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 114:1203–1209

Aston-Jones G, Bloom FE (1981a) Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 1:887–900

Aston-Jones G, Bloom FE (1981b) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1:876–886

Aston-Jones G, Foote SL, Bloom FE (1982) Low doses of ethanol disrupt sensory responses of brain noradrenergic neurones. *Nature* 296:857–860

Aton SJ, Seibt J, Dumoulin M, Jha SK, Steinmetz N, Coleman T, Naidoo N, Frank MG (2009) Mechanisms of sleep-dependent consolidation of cortical plasticity. *Neuron* 61:454–466

Azouz R, Gray CM (1999) Cellular mechanisms contributing to response variability of cortical neurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:2209–2223

Bajic D, Proudfit HK (1999) Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *The Journal of comparative neurology* 405:359–379

Barbaresi P, Spreafico R, Frassoni C, Rustioni A (1986) GABAergic neurons are present in the dorsal column nuclei but not in the ventroposterior complex of rats. *Brain research* 382:305–326

Ben-David B, Vaida S, Gaitini L (1995) The influence of high spinal anesthesia on sensitivity to midazolam sedation. *Anesthesia and analgesia* 81:525–528

Berkley KJ, Budell RJ, Blomqvist A, Bull M (1986) Output systems of the dorsal column nuclei in the cat. *Brain research* 396:199–225

Bernard JF, Peschanski M, Besson JM (1989) A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neuroscience letters* 100:83–88

Boivie J (1979) An anatomical reinvestigation of the termination of the spinothalamic tract in the monkey. *The Journal of comparative neurology* 186:343–369

Bonekat HW, Andersen G, Squires J (1990) Obstructive disordered breathing during sleep in patients with spinal cord injury. *Paraplegia* 28:392–398

Boord P, Siddall PJ, Tran Y, Herbert D, Middleton J, Craig A (2008) Electroencephalographic slowing and reduced reactivity in neuropathic pain following spinal cord injury. *Spinal cord* 46:118–123

Borsook D, Becerra L, Fishman S, Edwards A, Jennings CL, Stojanovic M, Papinicolas L, Ramachandran VS, Gonzalez RG, Breiter H (1998) Acute plasticity in the human somatosensory cortex following amputation. *Neuroreport* 9:1013–1017

Bowker RM, Westlund KN, Sullivan MC, Coulter JD (1982) Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. *Progress in brain research* 57:239–265

Brodmann K (1909) *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Hirzel, Leipzig

Brösamle C, Schwab ME (1997) Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *The Journal of comparative neurology* 386:293–303

Bruehlmeier M, Dietz V, Leenders KL, Roelcke U, Missimer J, Curt A (1998) How does the human brain deal with a spinal cord injury? *The European journal of neuroscience* 10:3918–3922

Byrne JA, Calford MB (1991) Short-term expansion of receptive fields in rat primary somatosensory cortex after hindpaw digit denervation. *Brain research* 565:218–224

Cadusseau J, Roger M (1992) [Connections of the posterior region of the thalamus in rats]. *Journal für Hirnforschung* 33:19–35

Calford MB, Tweedale R (1988) Immediate and chronic changes in responses of somatosensory cortex in adult flying-fox after digit amputation. *Nature* 332:446–448

Calford MB, Tweedale R (1991a) Acute changes in cutaneous receptive fields in primary somatosensory cortex after digit denervation in adult flying fox. *Journal of neurophysiology* 65:178–187

Calford MB, Tweedale R (1991b) Immediate expansion of receptive fields of neurons in area 3b of macaque monkeys after digit denervation. *Somatosensory & motor research* 8:249–260

Campbell JN, Meyer RA (2006) Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52:77–92

Canedo A (1997) Primary motor cortex influences on the descending and ascending systems. *Progress in neurobiology* 51:287–335

Canedo A, Aguilar J (2000) Spatial and cortical influences exerted on cuneothalamic and thalamocortical neurons of the cat. *The European journal of neuroscience* 12:2515–2533

Carlton SM, Du J, Tan HY, Nesic O, Hargett GL, Bopp AC, Yamani A, Lin Q, Willis WD, Hulsebosch CE (2009) Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain* 147:265–276

Carstens E, Leah J, Lechner J, Zimmermann M (1990) Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. *Neuroscience* 35:609–626

Castro-Alamancos MA (2000) Origin of synchronized oscillations induced by neocortical disinhibition in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:9195–9206

Castro-Alamancos MA (2004) Absence of rapid sensory adaptation in neocortex during information processing states. *Neuron* 41:455–464

Castro-Alamancos MA, Connors BW (1997) Thalamocortical synapses. *Progress in neurobiology* 51:581–606

Castro-Alamancos MA, Rigas P (2002) Synchronized oscillations caused by disinhibition in rodent neocortex are generated by recurrent synaptic activity mediated by AMPA receptors. *The Journal of physiology* 542:567–581

Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB (1985) Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 240:153–160

Cedarbaum JM, Aghajanian GK (1978) Activation of locus coeruleus neurons by peripheral stimuli: modulation by a collateral inhibitory mechanism. *Life sciences* 23:1383–1392

Chaouch A, Menetrey D, Binder D, Besson JM (1983) Neurons at the origin of the medial component of the bulbopontine spinoreticular tract in the rat: an anatomical study using horseradish peroxidase retrograde transport. *The Journal of comparative neurology* 214:309–320

Chapin JK, Lin CS (1984) Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *The Journal of comparative neurology* 229:199–213

Chauvette S, Seigneur J, Timofeev I (2012) Sleep oscillations in the thalamocortical system induce long-term neuronal plasticity. *Neuron* 75:1105–1113

Chauvette S, Volgushev M, Timofeev I (2010) Origin of active states in local neocortical networks during slow sleep oscillation. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 20:2660–2674

Cheema S, Rustioni A, Whitsel BL (1985) Sensorimotor cortical projections to the primate cuneate nucleus. *The Journal of comparative neurology* 240:196–211

Cheema S, Whitsel BL, Rustioni A (1983) The corticocuneate pathway in the cat: relations among terminal distribution patterns, cytoarchitecture, and single neuron functional properties. *Somatosensory research* 1:169–205

Chen R, Cohen LG, Hallett M (2002) Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 111:761–773

Chimelli L, Bello AR, Scaravilli F (1994) Development of cortical fibres into the gracile nucleus of the rat: an ultrastructural study. *Developmental neuroscience* 16:260–266

Chmielowska J, Carvell GE, Simons DJ (1989) Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat Sml barrel cortex. *The Journal of comparative neurology* 285:325–338

Civillico EF, Contreras D (2012) Spatiotemporal properties of sensory responses in vivo are strongly dependent on network context. *Frontiers in systems neuroscience* 6:25

Clark FM, Proudfit HK (1991) The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain research* 538:231–245

Clement CI, Keay KA, Podzebenko K, Gordon BD, Bandler R (2000) Spinal sources of noxious visceral and noxious deep somatic afferent drive onto the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *The Journal of comparative neurology* 425:323–344

Clement EA, Richard A, Thwaites M, Ailon J, Peters S, Dickson CT (2008) Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia. *PloS one* 3:e2004

Cliffer KD, Burstein R, Giesler GJ (1991) Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:852–868

Compte A, Sanchez-Vives MV, McCormick DA, Wang X-J (2003) Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) and wave propagations in a cortical network model. *Journal of neurophysiology* 89:2707–2725

Contreras D (2004.) Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural networks: the official journal of the International Neural Network Society* 17:633–646

Cowley KC, Schmidt BJ (1997) Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *Journal of neurophysiology* 77:247–259

Craig AD, Burton H (1981) Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center. *Journal of neurophysiology* 45:443–466

Crunelli V, Hughes SW (2010) The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nature neuroscience* 13:9–17

Curt A, Alkadhi H, Crelier GR, Boendermaker SH, Hepp-Reymond M-C, Kollias SS (2002) Changes of non-affected upper limb cortical representation in paraplegic patients as assessed by fMRI. *Brain: a journal of neurology* 125:2567–2578

Cusick CG, Wall JT, Whiting JH, Wiley RG (1990) Temporal progression of cortical reorganization following nerve injury. *Brain research* 537:355–358

Daniel H, Billard JM, Angaut P, Batini C (1987) The interposito-rubrospinal system. Anatomical tracing of a motor control pathway in the rat. *Neuroscience research* 5:87–112

Darian-Smith C, Gilbert CD (1994) Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex. *Nature* 368:737–740

Delgado JM, Ferrus A, Mora F, Rubia FJ (1998) *Manual de neurociencia (Síntesis, ed)* 1st ed

Desbois C, Le Bars D, Villanueva L (1999) Organization of cortical projections to the medullary subnucleus reticularis dorsalis: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 410:178–196

Deschênes M, Veinante P, Zhang ZW (1998) The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain research Brain research reviews* 28:286–308

Destexhe A, Hughes SW, Rudolph M, Crunelli V (2007) Are corticothalamic “up” states fragments of wakefulness? *Trends in neurosciences* 30:334–342

Ditunno JF, Young W, Donovan WH, Creasey G (1994) The international standards booklet for neurological and functional classification of spinal cord injury. American Spinal Injury Association. *Paraplegia* 32:70–80

Doetsch GS, Harrison TA, MacDonald AC, Litaker MS (1996) Short-term plasticity in primary somatosensory cortex of the rat: rapid changes in magnitudes and latencies of neuronal responses following digit denervation. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale* 112:505–512

Dostrovsky JO, Millar J, Wall PD (1976) The immediate shift of afferent drive to dorsal column nucleus cells following deafferentation: a comparison of acute and chronic deafferentation in gracile nucleus and spinal cord. *Experimental neurology* 52:480–495

Doufas AG, Wadhwa A, Shah YM, Lin C-M, Haugh GS, Sessler DI (2004) Block-dependent sedation during epidural anaesthesia is associated with delayed brainstem conduction. *British journal of anaesthesia* 93:228–234

Eappen S, Kissin I (1998) Effect of subarachnoid bupivacaine block on anesthetic requirements for thiopental in rats. *Anesthesiology* 88:1036–1042

Elam M, Svensson TH, Thorén P (1986) Locus coeruleus neurons and sympathetic nerves: activation by cutaneous sensory afferents. *Brain research* 366:254–261

Emmers R (1988) *Somesthetic System of the Rat*. Raven Press, ed.

Endo T, Spenger C, Tominaga T, Brené S, Olson L (2007) Cortical sensory map rearrangement after spinal cord injury: fMRI responses linked to Nogo signalling. *Brain : a journal of neurology* 130:2951–2961

Engineer ND, Riley JR, Seale JD, Vrana WA, Shetake JA, Sudanagunta SP, Borland MS, Kilgard MP (2011) Reversing pathological neural activity using targeted plasticity. *Nature* 470:101–104

Erchova IA, Lebedev MA, Diamond ME (2002) Somatosensory cortical neuronal population activity across states of anaesthesia. *The European journal of neuroscience* 15:744–752

Esteves AM, Mello MT, Squarcini CFR, Lancellotti CLP, Comparoni A, Tufik S (2007) Sleep patterns over 15-day period in rats with spinal cord injury. *Spinal cord* 45:360–366

Faggin BM, Nguyen KT, Nicolelis MA (1997) Immediate and simultaneous sensory reorganization at cortical and subcortical levels of the somatosensory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9428–9433

Faingold CL, Stittsworth JD (1980) Comparative effects of pentylenetetrazol on the sensory responsiveness of lateral geniculate and reticular formation neurons. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 49:168–172

Favero M, Varghese G, Castro-Alamancos MA (2012) The state of somatosensory cortex during neuromodulation. *Journal of neurophysiology* 108:1010–1024

Flor H, Elbert T, Knecht S, Wienbruch C, Pantev C, Birbaumer N, Larbig W, Taub E (1995) Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature* 375:482–484

Florence SL, Kaas JH (1995) Large-scale reorganization at multiple levels of the somatosensory pathway follows therapeutic amputation of the hand in

monkeys. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 15:8083–8095

Florence SL, Taub HB, Kaas JH (1998) Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys. Science (New York, NY) 282:1117–1121

Foffani G, Tutunculer B, Moxon KA (2004) Role of spike timing in the forelimb somatosensory cortex of the rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:7266–7271

Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77:3033–3037

Fox K, Armstrong-James M (1986) The role of the anterior intralaminar nuclei and N-methyl D-aspartate receptors in the generation of spontaneous bursts in rat neocortical neurones. Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale 63:505–518

Francis JT, Xu S, Chapin JK (2008) Proprioceptive and cutaneous representations in the rat ventral posterolateral thalamus. Journal of neurophysiology 99:2291–2304

Friedberg MH, Lee SM, Ebner FF (1999) Modulation of receptive field properties of thalamic somatosensory neurons by the depth of anesthesia. Journal of neurophysiology 81:2243–2252

Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. The Journal of comparative neurology 435:379–387

Gentili M, Huu PC, Enel D, Hollande J, Bonnet F (1998) Sedation depends on the level of sensory block induced by spinal anaesthesia. British journal of anaesthesia 81:970–971

Ghosh A, Haiss F, Sydekum E, Schneider R, Gullo M, Wyss MT, Mueggler T, Baltes C, Rudin M, Weber B, Schwab ME (2010) Rewiring of hindlimb corticospinal neurons after spinal cord injury. *Nature neuroscience* 13:97–104

Ghosh A, Peduzzi S, Snyder M, Schneider R, Starkey M, Schwab ME (2011) Heterogeneous Spine Loss in Layer 5 Cortical Neurons after Spinal Cord Injury. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991)

Ghosh A, Sydekum E, Haiss F, Peduzzi S, Zörner B, Schneider R, Baltes C, Rudin M, Weber B, Schwab ME (2009) Functional and anatomical reorganization of the sensory-motor cortex after incomplete spinal cord injury in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12210–12219

Giesler GJ, Spiel HR, Willis WD (1981) Organization of spinothalamic tract axons within the rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology* 195:243–252

Goloshevsky AG, Silva AC, Dodd SJ, Koretsky AP (2008) BOLD fMRI and somatosensory evoked potentials are well correlated over a broad range of frequency content of somatosensory stimulation of the rat forepaw. *Brain research* 1195:67–76

Green JB, Sora E, Bialy Y, Ricamato A, Thatcher RW (1998) Cortical sensorimotor reorganization after spinal cord injury: an electroencephalographic study. *Neurology* 50:1115–1121

Guilbaud G, Oliveras JL, Giesler G, Besson JM (1977) Effects induced by stimulation of the centralis inferior nucleus of the raphe on dorsal horn interneurons in cat's spinal cord. *Brain research* 126:355–360

Gustin SM, Peck CC, Cheney LB, Macey PM, Murray GM, Henderson LA (2012) Pain and plasticity: is chronic pain always associated with somatosensory cortex activity and reorganization? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:14874–14884

Gwak YS, Crown ED, Unabia GC, Hulsebosch CE (2008) Propentofylline attenuates allodynia, glial activation and modulates GABAergic tone after spinal cord injury in the rat. *Pain* 138:410–422

Gwak YS, Kang J, Unabia GC, Hulsebosch CE (2012) Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Experimental neurology* 234:362–372

Gybels JM, Sweet WH (1989) Neurosurgical treatment of persistent pain. Physiological and pathological mechanisms of human pain. *Pain and headache* 11:1–402

Hains BC, Black JA, Waxman SG (2003) Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *The Journal of comparative neurology* 462:328–341

Hains BC, Saab CY, Waxman SG (2005) Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 128:2359–2371

Halder SK, Matsunaga H, Ish KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H (2013) Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *Journal of neurochemistry*.

Hallanger AE, Levey AI, Lee HJ, Rye DB, Wainer BH (1987) The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 262:105–124

Harmann PA, Carlton SM, Willis WD (1988) Collaterals of spinothalamic tract cells to the periaqueductal gray: a fluorescent double-labeling study in the rat. *Brain research* 441:87–97

Hasenstaub A, Sachdev RNS, McCormick DA (2007) State changes rapidly modulate cortical neuronal responsiveness. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9607–9622

Henny P, Jones BE (2008) Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *The European journal of neuroscience* 27:654–670

Herkenham M (1980) Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science (New York, NY)* 207:532–535

Hirata A, Aguilar J, Castro-Alamancos MA (2009) Influence of subcortical inhibition on barrel cortex receptive fields. *Journal of neurophysiology* 102:437–450

Hirata A, Castro-Alamancos MA (2010) Neocortex network activation and deactivation states controlled by the thalamus. *Journal of neurophysiology* 103:1147–1157

Hirata A, Castro-Alamancos MA (2011) Effects of cortical activation on sensory responses in barrel cortex. *Journal of neurophysiology* 105:1495–1505

Hirata H, Aston-Jones G (1994) A novel long-latency response of locus coeruleus neurons to noxious stimuli: mediation by peripheral C-fibers. *Journal of neurophysiology* 71:1752–1761

Hirouchi Y, Suzuki E, Mitsuoka C, Jin H, Kitajima S, Kohjimoto Y, Enomoto M, Kugino K (2007) Neuroimaging and histopathological evaluation of delayed neurological damage produced by artificial occlusion of the middle cerebral artery in Cynomolgus monkeys: establishment of a monkey model for delayed cerebral ischemia. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 59:9–16

Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science (New York, NY)* 189:55–58

Hodgson PS, Liu SS (2001) Epidural lidocaine decreases sevoflurane requirement for adequate depth of anesthesia as measured by the Bispectral Index monitor. *Anesthesiology* 94:799–803

Hodgson PS, Liu SS, Gras TW (1999) Does epidural anesthesia have general anesthetic effects? A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anesthesiology* 91:1687–1692

Hofstetter CP, Schweinhardt P, Klason T, Olson L, Spenger C (2003) Numb rats walk - a behavioural and fMRI comparison of mild and moderate spinal cord injury. *The European journal of neuroscience* 18:3061–3068

Inagaki Y, Mashimo T, Kuzukawa A, Tsuda Y, Yoshiya I (1994) Epidural lidocaine delays arousal from isoflurane anesthesia. *Anesthesia and analgesia* 79:368–372

Iwata K, Kenshalo DR, Dubner R, Nahin RL (1992) Diencephalic projections from the superficial and deep laminae of the medullary dorsal horn in the rat. *The Journal of comparative neurology* 321:404–420

Iwata M, LeBlanc BW, Kadasi LM, Zerah ML, Cosgrove RG, Saab CY (2011) High-frequency stimulation in the ventral posterolateral thalamus reverses electrophysiologic changes and hyperalgesia in a rat model of peripheral neuropathic pain. *Pain* 152:2505–2513.

Jacobs KM, Donoghue JP (1991) Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science (New York, NY)* 251:944–947

Jain N, Catania KC, Kaas JH (1997) Deactivation and reactivation of somatosensory cortex after dorsal spinal cord injury. *Nature* 386:495–498

Jain N, Florence SL, Kaas JH (1995) Limits on plasticity in somatosensory cortex of adult rats: hindlimb cortex is not reactivated after dorsal column section. *Journal of neurophysiology* 73:1537–1546

Jain N, Qi H-X, Collins CE, Kaas JH (2008) Large-scale reorganization in the somatosensory cortex and thalamus after sensory loss in macaque monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:11042–11060

Jurkiewicz MT, Crawley AP, Verrier MC, Fehlings MG, Mikulis DJ (2006) Somatosensory cortical atrophy after spinal cord injury: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 66:762–764

Kaas JH, Merzenich MM, Killackey HP (1983) The reorganization of somatosensory cortex following peripheral nerve damage in adult and developing mammals. *Annual review of neuroscience* 6:325–356

Kaas JH, Qi H-X, Burish MJ, Gharbawie OA, Onifer SM, Massey JM (2008) Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Experimental neurology* 209:407–416

Kao T, Shumsky JS, Knudsen EB, Murray M, Moxon KA (2011) Functional role of exercise-induced cortical organization of sensorimotor cortex after spinal transection. *Journal of neurophysiology* 106:2662–2674

Kao T, Shumsky JS, Murray M, Moxon KA (2009) Exercise induces cortical plasticity after neonatal spinal cord injury in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:7549–7557

Keck T, Scheuss V, Jacobsen RI, Wierenga CJ, Eysel UT, Bonhoeffer T, Hübener M (2011) Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex. *Neuron* 71:869–882

Kelahan AM, Doetsch GS (1984) Time-dependent changes in the functional organization of somatosensory cerebral cortex following digit amputation in adult raccoons. *Somatosensory research* 2:49–81

Kenet T, Bibitchkov D, Tsodyks M, Grinvald A, Arieli A (2003) Spontaneously emerging cortical representations of visual attributes. *Nature* 425:954–956

Kevetter GA, Willis WD (1982) Spinothalamic cells in the rat lumbar cord with collaterals to the medullary reticular formation. *Brain research* 238:181–185

Kevetter GA, Willis WD (1983) Collaterals of spinothalamic cells in the rat. *The Journal of comparative neurology* 215:453–464

Kharazia VN, Weinberg RJ (1994) Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:6021–6032

Kirshblum SC, Memmo P, Kim N, Campagnolo D, Millis S (2002) Comparison of the revised 2000 American Spinal Injury Association classification standards with the 1996 guidelines. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 81:502–505

Kisley MA, Gerstein GL (1999) Trial-to-trial variability and state-dependent modulation of auditory-evoked responses in cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:10451–10460

Klit H, Finnerup NB, Jensen TS (2009) Central post-stroke pain: clinical characteristics, pathophysiology, and management. *Lancet neurology* 8:857–868

Kuypers HG (1958) An anatomical analysis of cortico-bulbar connexions to the pons and lower brain stem in the cat. *Journal of anatomy* 92:198–218

Kuypers HG, Tuerk JD (1964) the distribution of the cortical fibres within the nuclei cuneatus and gracilis in the cat. *Journal of anatomy* 98:143–162

Lakatos P, Karmos G, Mehta AD, Ulbert I, Schroeder CE (2008) Entrainment of neuronal oscillations as a mechanism of attentional selection. *Science (New York, NY)* 320:110–113

Landisman CE, Connors BW (2007) VPM and PoM nuclei of the rat somatosensory thalamus: intrinsic neuronal properties and corticothalamic feedback. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 17:2853–2865

Lee BH, Lee KH, Kim UJ, Yoon DH, Sohn J-H, Choi SS, Yi I-G, Park YG (2004) Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain. *Brain research* 1020:37–44

Lee JH, Beitz AJ (1993) The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. *Pain* 52:11–28

Leiras R, Velo P, Martín-Cora F, Canedo A (2010) Processing afferent proprioceptive information at the main cuneate nucleus of anesthetized cats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:15383–15399

Leong SK, Tan CK (1987) Central projection of rat sciatic nerve fibres as revealed by Ricinus communis agglutinin and horseradish peroxidase tracers. *Journal of anatomy* 154:15–26

Levy LM, Ziemann U, Chen R, Cohen LG (2002) Rapid modulation of GABA in sensorimotor cortex induced by acute deafferentation. *Annals of neurology* 52:755–761

Lilja J, Endo T, Hofstetter C, Westman E, Young J, Olson L, Spenger C (2006) Blood oxygenation level-dependent visualization of synaptic relay stations of sensory pathways along the neuroaxis in response to graded sensory stimulation of a limb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:6330–6336

Lima D, Coimbra A (1989) Morphological types of spinomesencephalic neurons in the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord, as shown after retrograde labelling with cholera toxin subunit B. *The Journal of comparative neurology* 279:327–339

Lindvall O, Björklund A, Moore RY, Stenevi U (1974) Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain research* 81:325–331

Liu RP (1983) Laminar origins of spinal projection neurons to the periaqueductal gray of the rat. *Brain research* 264:118–122

Liu RP (1986) Spinal neuronal collaterals to the intralaminar thalamic nuclei and periaqueductal gray. *Brain research* 365:145–150

Llinás R, Ribary U (1993) Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2078–2081

Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A (2001) Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412:150–157

Loomis AL, Harvey EN, Hobart G (1935) Further observations on the potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. *Science (New York, NY)* 82:198–200

Lotze M, Grodd W, Birbaumer N, Erb M, Huse E, Flor H (1999) Does use of a myoelectric prosthesis prevent cortical reorganization and phantom limb pain? *Nature neuroscience* 2:501–502

Luczak A, Barthó P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD (2007) Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:347–352

Lund RD, Webster KE (1967) Thalamic afferents from the spinal cord and trigeminal nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 130:313–328

Manjarrez E, Rojas-Piloni G, Vazquez D, Flores A (2002) Cortical neuronal ensembles driven by dorsal horn spinal neurones with spontaneous activity in the cat. *Neuroscience letters* 318:145–148

Marik SA, Yamahachi H, McManus JNJ, Szabo G, Gilbert CD (2010) Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. *PLoS biology* 8:e1000395

Mariño J, Aguilar J, Canedo A (1999) Cortico-subcortical synchronization in the chloralose-anesthetized cat. *Neuroscience* 93:409–411

Marino J, Canedo A, Aguilar J (2000) Sensorimotor cortical influences on cuneate nucleus rhythmic activity in the anesthetized cat. *Neuroscience* 95:657–673

Martin GF, Vertes RP, Waltzer R (1985) Spinal projections of the gigantocellular reticular formation in the rat. Evidence for projections from different areas to laminae I and II and lamina IX. *Experimental brain research* Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale 58:154–162

Martinez-Lorezana G, Machín R, Avendaño C (2001) Definite segregation of cortical neurons projecting to the dorsal column nuclei in the rat. *Neuroreport* 12:413–416

Maslany S, Crockett DP, Egger MD (1991) Somatotopic organization of the dorsal column nuclei in the rat: transganglionic labelling with B-HRP and WGA-HRP. *Brain research* 564:56–65

Masri R, Keller A (2012) Chronic pain following spinal cord injury. *Advances in experimental medicine and biology* 760:74–88

Masri R, Quiton RL, Lucas JM, Murray PD, Thompson SM, Keller A (2009) Zona incerta: a role in central pain. *Journal of neurophysiology* 102:181–191

Massimini M, Huber R, Ferrarelli F, Hill S, Tononi G (2004) The sleep slow oscillation as a traveling wave. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:6862–6870

Maynard FM, Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF, Donovan WH, Ducker TB, Garber SL, Marino RJ, Stover SL, Tator CH, Waters RL, Wilberger JE, Young W (1997) International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal cord* 35:266–274

McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of neurophysiology* 54:782–806

Menétrey D, Chaouch A, Binder D, Besson JM (1982) The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *The Journal of comparative neurology* 206:193–207

Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M, Felleman D (1983a) Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience* 8:33–55

Merzenich MM, Kaas JH, Wall JT, Sur M, Nelson RJ, Felleman DJ (1983b) Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience* 10:639–665

Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A, Zook JM (1984) Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *The Journal of comparative neurology* 224:591–605

Mohajerani MH, McVea DA, Fingas M, Murphy TH (2010) Mirrored bilateral slow-wave cortical activity within local circuits revealed by fast bihemispheric voltage-sensitive dye imaging in anesthetized and awake mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:3745–3751

Molander C, Xu Q, Grant G (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *The Journal of comparative neurology* 230:133–141

Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G (1989) Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *The Journal of comparative neurology* 289:375–385

Moolenaar GM, Holloway JA, Trough CO (1976) Responses of caudal raphe neurons to peripheral somatic stimulation. *Experimental neurology* 53:304–313

Moore CI, Stern CE, Dunbar C, Kostyk SK, Gehi A, Corkin S (2000) Referred phantom sensations and cortical reorganization after spinal cord injury in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:14703–14708

Morales-Botello ML, Aguilar J, Foffani G (2012) Imaging the spatio-temporal dynamics of supragranular activity in the rat somatosensory cortex in response to stimulation of the paws. *PloS one* 7:e40174

Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1:455–473

Mountcastle VB, Steinmetz MA, Romo R (1990) Frequency discrimination in the sense of flutter: psychophysical measurements correlated with postcentral events in behaving monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:3032–3044

Moxon KA, Hale LL, Aguilar J, Foffani G (2008) Responses of infragranular neurons in the rat primary somatosensory cortex to forepaw and hindpaw tactile stimuli. *Neuroscience* 156:1083–1092

Nahin RL, Madsen AM, Giesler GJ (1986) Funicular location of the ascending axons of neurons adjacent to the spinal cord central canal in the rat. *Brain research* 384:367–372

Nahin RL, Micevych PE (1986) A long ascending pathway of enkephalin-like immunoreactive spinoreticular neurons in the rat. *Neuroscience letters* 65:271–276

Nord SG (1967) Somatotopic organization in the spinal trigeminal nucleus, the dorsal column nuclei and related structures in the rat. *The Journal of comparative neurology* 130:343–356

Pagliardini S, Greer JJ, Funk GD, Dickson CT (2012) State-dependent modulation of breathing in urethane-anesthetized rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:11259–11270

Palecek J, Paleckova V, Willis WD (2002) The roles of pathways in the spinal cord lateral and dorsal funiculi in signaling nociceptive somatic and visceral stimuli in rats. *Pain* 96:297–307

Paxino G (2004) The rat nervous system (Elsevier,ed) 3th ed

Paxino G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates (Elsevier, ed)., 6th ed.

Pechura CM, Liu RP (1986) Spinal neurons which project to the Pechura CM, Liu RP (1986) Spinal neurons which project to the periaqueductal gray and the medullary reticular formation via axon collaterals: a double-label fluorescence study in the rat. Brain research 374:357–361

Peschanski M, Besson JM (1984a) Coerulear projections to the lateral diencephalon in the rat. An anatomical study using wheat-germ agglutinin conjugated to HRP. Neuroscience letters 46:329–334

Peschanski M, Besson JM (1984b) Diencephalic connections of the raphe nuclei of the rat brainstem: an anatomical study with reference to the somatosensory system. The Journal of comparative neurology 224:509–534

Peschanski M, Besson JM (1984c) A spino-reticulo-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. Neuroscience 12:165–178

Peschanski M, Kayser V, Besson JM (1986) Behavioral evidence for a crossed ascending pathway for pain transmission in the anterolateral quadrant of the rat spinal cord. Brain research 376:164–168

Peschanski M, Mantyh PW, Besson JM (1983) Spinal afferents to the ventrobasal thalamic complex in the rat: an anatomical study using wheat-germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. Brain research 278:240–244

Petersen CCH, Hahn TTG, Mehta M, Grinvald A, Sakmann B (2003) Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:13638–13643

Peterson BW, Franck JI, Daunton NG (1976) Changes in responses of medial pontomedullary reticular neurons during repetitive cutaneous,

vestibular, cortical, and tectal stimulation. *Journal of neurophysiology* 39:564–581

Pinault D, Deschênes M (1998a) Anatomical evidence for a mechanism of lateral inhibition in the rat thalamus. *The European journal of neuroscience* 10:3462–3469

Pinault D, Deschênes M (1998b) Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: a three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. *The Journal of comparative neurology* 391:180–203

Pogliano C (2012) Penfield's homunculus and other grotesque creatures from the Land of If. *Nuncius / Istituto e museo di storia della scienza* 27:141–162

Pollock JE, Neal JM, Liu SS, Burkhead D, Polissar N (2000) Sedation during spinal anesthesia. *Anesthesiology* 93:728–734

Pons TP, Garraghty PE, Ommaya AK, Kaas JH, Taub E, Mishkin M (1991) Massive cortical reorganization after sensory deafferentation in adult macaques. *Science (New York, NY)* 252:1857–1860

Price (1995) *The rat nervous system*. 2nd ed

Puig MV, Ushimaru M, Kawaguchi Y (2008) Two distinct activity patterns of fast-spiking interneurons during neocortical UP states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:8428–8433

Quiton RL, Masri R, Thompson SM, Keller A (2010) Abnormal activity of primary somatosensory cortex in central pain syndrome. *Journal of neurophysiology* 104:1717–1725

Redondo-Castro E, García-Alías G, Navarro X (2013) Plastic changes in lumbar segments after thoracic spinal cord injuries in adult rats: An integrative view of spinal nociceptive dysfunctions. *Restorative neurology and neuroscience*

Reig R, Sanchez-Vives MV (2007) Synaptic transmission and plasticity in an active cortical network. *PloS one* 2:e670

Ren Y, Zhang L, Lu Y, Yang H, Westlund KN (2009) Central lateral thalamic neurons receive noxious visceral mechanical and chemical input in rats. *Journal of neurophysiology* 102:244–258

Rigas P, Castro-Alamancos MA (2004) Leading role of the piriform cortex over the neocortex in the generation of spontaneous interictal spikes during block of GABA(A) receptors. *Neuroscience* 124:953–961

Rigas P, Castro-Alamancos MA (2007) Thalamocortical Up states: differential effects of intrinsic and extrinsic cortical inputs on persistent activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:4261–4272

Rivadulla C, Martinez L, Grieve KL, Cudeiro J (2003) Receptive field structure of burst and tonic firing in feline lateral geniculate nucleus. *The Journal of physiology* 553:601–610

Rivero-Melián C (1996) Organization of hindlimb nerve projections to the rat spinal cord: a choleragenoid horseradish peroxidase study. *The Journal of comparative neurology* 364:651–663

Ruiz-Mejias M, Ciria-Suarez L, Mattia M, Sanchez-Vives MV (2011) Slow and fast rhythms generated in the cerebral cortex of the anesthetized mouse. *Journal of neurophysiology* 106:2910–2921

Sachdev RNS, Ebner FF, Wilson CJ (2004) Effect of subthreshold up and down states on the whisker-evoked response in somatosensory cortex. *Journal of neurophysiology* 92:3511–3521

Sakata S, Harris KD (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron* 64:404–418

Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nature neuroscience* 3:1027–1034

Sandkühler J, Stelzer B, Fu QG (1993) Characteristics of propriospinal modulation of nociceptive lumbar spinal dorsal horn neurons in the cat. *Neuroscience* 54:957–967

Satoh K, Fibiger HC (1986) Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *The Journal of comparative neurology* 253:277–302

Sceniak MP, Maciver MB (2006) Cellular actions of urethane on rat visual cortical neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* 95:3865–3874

Scheer FAJL, Zeitzer JM, Ayas NT, Brown R, Czeisler CA, Shea SA (2006) Reduced sleep efficiency in cervical spinal cord injury; association with abolished night time melatonin secretion. *Spinal cord* 44:78–81

Schulman JJ, Cancro R, Lowe S, Lu F, Walton KD, Llinás RR (2011) Imaging of thalamocortical dysrhythmia in neuropsychiatry. *Frontiers in human neuroscience* 5:69

Seelke AMH, Dooley JC, Krubitzer LA (2012) The emergence of somatotopic maps of the body in S1 in rats: the correspondence between functional and anatomical organization. *PloS one* 7:e32322

Sherman SM, Guillery RW (2001) Exploring the thalamus and its role in cortical function, (Academic press, ed) 2nded

Simões EL, Bramati I, Rodrigues E, Franzoi A, Moll J, Lent R, Tovar-Moll F (2012) Functional expansion of sensorimotor representation and structural reorganization of callosal connections in lower limb amputees. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:3211–3220

Smith KJ, Bennett BJ (1987) Topographic and quantitative description of rat dorsal column fibres arising from the lumbar dorsal roots. *Journal of anatomy* 153:203–215

Springfield SA, Moolenaar GM (1983) Differences in the responses of raphe nuclei to repetitive somatosensory stimulation. *Experimental neurology* 79:360–370

Steriade M (1997) Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 7:583–604

Steriade M (2004) Neocortical cell classes are flexible entities. *Nature reviews Neuroscience* 5:121–134

Steriade M (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137:1087–1106

Steriade M, Amzica F, Contreras D (1996) Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous cortical rhythms during brain activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:392–417

Steriade M, Contreras D, Amzica F (1994) Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments. *Trends in neurosciences* 17:199–208

Steriade M, Contreras D, Curró Dossi R, Nuñez A (1993) The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:3284–3299

Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:2541–2559

Steriade M, Llinás RR (1988) The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiological reviews* 68:649–742

Steriade M, Nuñez A, Amzica F (1993) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:3252–3265

Strominger RN, McGiffen JE, Strominger NL (1987) Morphometric and experimental studies of the red nucleus in the albino rat. *The Anatomical record* 219:420–428

Swett JE, McMahon SB, Wall PD (1985) Long ascending projections to the midbrain from cells of lamina I and nucleus of the dorsolateral funiculus of the rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology* 238:401–416

Swett JE, Wikholm RP, Blanks RH, Swett AL, Conley LC (1986) Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Experimental neurology* 93:227–252.

Talbot WH, Darian-Smith I, Kornhuber HH, Mountcastle VB (1968) The sense of flutter-vibration: comparison of the human capacity with response patterns of mechanoreceptive afferents from the monkey hand. *Journal of neurophysiology* 31:301–334

Tandon S, Kambi N, Lazar L, Mohammed H, Jain N (2009) Large-scale expansion of the face representation in somatosensory areas of the lateral sulcus after spinal cord injuries in monkeys. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12009–12019

Thomson AM, Lamy C (2007) Functional maps of neocortical local circuitry. *Frontiers in neuroscience* 1:19–42

Timofeev I, Grenier F, Steriade M (2000) Impact of intrinsic properties and synaptic factors on the activity of neocortical networks in vivo. *Journal of physiology, Paris* 94:343–355

Tran Y, Boord P, Middleton J, Craig A (2004) Levels of brain wave activity (8-13 Hz) in persons with spinal cord injury. *Spinal cord* 42:73–79

Tsodyks M, Kenet T, Grinvald A, Arieli A (1999) Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science (New York, NY)* 286:1943–1946

Tudor M, Tudor L, Tudor KI (2005) [Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography]. *Acta medica Croatica : časopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti* 59:307–313

Turnbull BG, Rasmusson DD (1990) Acute effects of total or partial digit denervation on raccoon somatosensory cortex. *Somatosensory & motor research* 7:365–389

Tverskoy M, Shagal M, Finger J, Kissin I (1994.) Subarachnoid bupivacaine blockade decreases midazolam and thiopental hypnotic requirements. *Journal of clinical anesthesia* 6:487–490

Tverskoy M, Shifrin V, Finger J, Fleyshman G, Kissin I (1996.) Effect of epidural bupivacaine block on midazolam hypnotic requirements. *Regional anesthesia* 21:209–213

Veinante P, Lavallée P, Deschênes M (2000) Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *The Journal of comparative neurology* 424:197–204

Viaene AN, Petrof I, Sherman SM (2011) Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:18156–18161

Vyazovskiy VV, Olcese U, Lazimy YM, Faraguna U, Esser SK, Williams JC, Cirelli C, Tononi G (2009) Cortical firing and sleep homeostasis. *Neuron* 63:865–878

Waite PM (1973) Somatotopic organization of vibrissal responses in the ventro-basal complex of the rat thalamus. *The Journal of physiology* 228:527–540

Wall JT, Cusick CG (1984) Cutaneous responsiveness in primary somatosensory (S-I) hindpaw cortex before and after partial hindpaw deafferentation in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4:1499–1515

Wall PD, Egger MD (1971) Formation of new connexions in adult rat brains after partial deafferentation. *Nature* 232:542–545

Walton KD, Llinás RR (2010) Central Pain as a Thalamocortical Dysrhythmia: A Thalamic Efference Disconnection? In: Kruger L, Light AR, editors. Translational Pain Research: From Mouse to Man. Boca Raton, FL: CRC Press; **2010**. Chapter 13

Wasner G, Lee BB, Engel S, McLachlan E (2008) Residual spinothalamic tract pathways predict development of central pain after spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 131:2387–2400

Waterhouse BD, Devilbiss D, Seiple S, Markowitz R (2004) Sensorimotor-related discharge of simultaneously recorded, single neurons in the dorsal raphe nucleus of the awake, unrestrained rat. *Brain research* 1000:183–191

Weinberg RJ, Rustioni A (1989) Brainstem projections to the rat cuneate nucleus. *The Journal of comparative neurology* 282:142–156

Woolsey TA, Welker C, Schwartz RH (1975) Comparative anatomical studies of the SmL face cortex with special reference to the occurrence of “barrels” in layer IV. *The Journal of comparative neurology* 164:79–94

Wörgötter F, Suder K, Zhao Y, Kerscher N, Eysel UT, Funke K (1998) State-dependent receptive-field restructuring in the visual cortex. *Nature* 396:165–168

Wrigley PJ, Press SR, Gustin SM, Macefield VG, Gandevia SC, Cousins MJ, Middleton JW, Henderson LA, Siddall PJ (2009) Neuropathic pain and primary somatosensory cortex reorganization following spinal cord injury. *Pain* 141:52–59

Wydenkeller S, Maurizio S, Dietz V, Halder P (2009) Neuropathic pain in spinal cord injury: significance of clinical and electrophysiological measures. *The European journal of neuroscience* 30:91–99

Yague JG, Foffani G, Aguilar J (2011) Cortical hyperexcitability in response to preserved spinothalamic inputs immediately after spinal cord hemisection. *Experimental neurology* 227:252–263

Yamahachi H, Marik SA, McManus JNJ, Denk W, Gilbert CD (2009) Rapid axonal sprouting and pruning accompany functional reorganization in primary visual cortex. *Neuron* 64:719–729

Yeziarski RP, Mendez CM (1991) Spinal distribution and collateral projections of rat spinomesencephalic tract cells. *Neuroscience* 44:113–130

Yoo K, Hwang J, Jeong S, Kim S, Bae H, Choi J, Chung S, Lee J (2006) Anesthetic requirements and stress hormone responses in spinal cord-injured patients undergoing surgery below the level of injury. *Anesthesia and analgesia* 102:1223–1228

Yuste R, MacLean JN, Smith J, Lansner A (2005) The cortex as a central pattern generator. *Nature reviews Neuroscience* 6:477–483

Zemlan FP, Leonard CM, Kow LM, Pfaff DW (1978) Ascending tracts of the lateral columns of the rat spinal cord: a study using the silver impregnation and horseradish peroxidase techniques. *Experimental neurology* 62:298–334

Zhang ZW, Deschênes M (1997) Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:6365–6379

Zhang ZW, Deschênes M (1998) Projections to layer VI of the posteromedial barrel field in the rat: a reappraisal of the role of corticothalamic pathways. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 8:428–436